

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

PROPAGACION IN VITRO DE PLANTAS DE FRESA
(Fragaria ananassa)

Tesis de Licenciatura

Que para obtener el Grado de

B I O L O G O

p r e s e n t a

José María Villarías Zugazagoitia

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PROPAGACION in vitro DE PLANTAS DE FRESA (*Fragaria ananassa*)

1. RESUMEN

En el presente trabajo se probó la respuesta de las variedades de fresa Fern, Douglas y Tioga en cinco medios distintos de propagación y en otros tantos de enraizamiento. Además, se calcularon los costos de producción de las plantas en los distintos medios nutritivos, con el objeto de usar el medio más efectivo y barato a nivel industrial.

Se encontró que las tres variedades respondieron positivamente en los medios de propagación, excepto en el medio III, cuyo rendimiento resultó inferior al de los datos publicados.

La que dio mayor número de brotes fue Tioga en el medio IV, seguida de Douglas y Fern en los medios V y IV respectivamente. Por su parte, todos los medios de enraizamiento que se probaron permitieron el desarrollo de raíces en las plantas de fresa. Los medios de propagación más económicos correspondieron al II, V y IV en ese orden y los de enraizamiento fueron el VII, X y XI.

Los resultados obtenidos permiten predecir que la técnica puede desarrollarse exitosamente en México, siempre y cuando alguna empresa se interese en financiar los proyectos de investigación tecnológica y que tenga el suficiente capital para montar las instalaciones requeridas para el caso.

2. INTRODUCCION

2.1. El cultivo de tejidos vegetales

2.1.1. Definición e historia

El cultivo de células, tejidos y fragmentos de plantas es una de las ramas de la biotecnología que ha cobrado mayor auge en los últimos años. Según la definición general establecida por Street en 1977, el término de cultivo de tejidos "puede aplicarse a cualquier cultivo pluricelular colocado en un medio sólido o sujeto a un sustrato y nutrido con un medio líquido, con el que las células se encuentran en continuidad protoplásmica" (9). En otras palabras, esta herramienta comprende un conjunto de técnicas que permiten mantener grupos de células vegetales con vida, en condiciones artificiales, controladas y asépticas. Para lograr esto, se colocan distintas porciones de la planta en medios nutritivos minerales, complementados con fuentes de carbono, vitaminas, reguladores del crecimiento, gelificantes o soportes y, en ocasiones, con otros compuestos orgánicos mucho más complejos como agua de coco, hidrolizado de caseína, jugos y pulpas de frutas, etc.

El desarrollo de esta técnica ha sido un acontecimiento propio del siglo XX, pero es posible rastrear sus antecedentes teóricos y prácticos desde el siglo pasado. Por ejemplo, el concepto de totipotencialidad o capacidad de la célula para regenerar un organismo completo, acuñado por Morgan (1901) y Goebel (1902), tiene sus orígenes en el postulado de la teoría celular (Schleiden y Schwann, 1839) que señala la posibilidad de que una célula somática se desarrolle independientemente, si se

le proveen las condiciones externas adecuadas. Asimismo, quizá las investigaciones de Vöchting (1878, 1892) sobre la polaridad en la formación de yemas y raíces, los descubrimientos de Reehinger (1893) acerca de la aparición de callos en fragmentos aislados de tallos y raíces, junto con los de Sacks (1860) y Knop (1861) que propusieron soluciones nutritivas al saber que los principales nutrientes de las plantas son minerales, llevaron a Haberlandt a realizar en 1902 la primera tentativa de cultivar células *in vitro*. Aunque falló en el intento, fueron los primeros experimentos que se realizaron en el área, además de sentar las bases para el hallazgo futuro de las condiciones necesarias para lograrlo (9, 15).

Es prácticamente imposible dar cuenta de todas las investigaciones efectuadas a lo largo de los casi noventa años que han transcurrido desde entonces. Para mencionar sólo algunas de ellas, junto con sus autores, pueden apuntarse las siguientes: los primeros cultivos exitosos de órganos y el descubrimiento de la importancia de las vitaminas y de las auxinas para el crecimiento radical y vegetal (White, 1934 y 1937); los reportes sobre crecimiento indefinido de callos en medios artificiales (Nobécourt, Gautheret y White, 1939); los trabajos de organogénesis de Skoog (1944); el uso de meristemas para regenerar plantas de dalia libres de virus (Ball, 1946); los primeros cultivos de monocotiledóneas (Morel y Wetmore, 1951); el hallazgo de la cinetina y el principio de los cultivos en suspensión (Miller y Skoog; Miur, 1953); la descripción del fenómeno de embriogénesis en cultivos de zanahoria (Steward y Reinert, 1958); la obtención de los primeros protoplastos

(Cocking, 1960); el cultivo de anteras para regenerar plantas haploides a partir de granos de polen (Guha y Maheshwari, 1964), etc. (9, 15).

En México, el cultivo de tejidos vegetales se comenzó a desarrollar a partir de 1970, al firmar un convenio con Japón que permitió el traslado de un grupo de científicos de ese país para trabajar en el Colegio de Postgraduados de Chapingo. Desde entonces a la fecha son varias las instituciones que han formado recursos humanos calificados y que cuentan con una infraestructura capaz de permitir su uso en áreas de investigación y de aplicación tecnológica. Aunque hasta ahora la participación de la industria y de la iniciativa privada es escasa o nula, la disciplina ofrece posibilidades interesantes de avance para empresas agroindustriales y de floricultura, así como para la industria farmacéutica nacional.

2.1.2. Tipos de cultivos

Los dos principales fenómenos de diferenciación vegetal que se asocian con el cultivo de tejidos son la organogénesis y la embriogénesis somática, cuyas características importantes se explican a continuación:

a) Organogénesis.- Este proceso permite la diferenciación o rediferenciación de las células para originar estructuras unipolares como brotes o raíces. En otras palabras, es la generación de *novo* de brotes y raíces mediante cultivo de tejidos.

Los factores más importantes que condicionan este proceso son 1) los componentes químicos del medio, 2) los compuestos

internos que se liberan durante el cultivo y 3) las sustancias presentes en el "explantado" inicial.

La organogénesis puede ser directa, cuando los fragmentos de plantas generan, en un medio de cultivo específico, raíces (rizogénesis) o brotes (caulogénesis) sin pasar por una etapa de callo. O bien, puede estar mediada por una respuesta previa de desdiferenciación; en este caso, los callos tienen que subcultivarse a otro medio diferente que induzca los procesos de morfogénesis.

b) Embriogénesis somática.- Este fenómeno implica la diferenciación de las células para generar estructuras bipolares, es decir, con una región que corresponderá al brote y otra que originará la raíz. Durante su desarrollo, dicha estructura pasa por los tres estados típicos de un embrión: corazón, globular y torpedo.

Los embriones somáticos se generan a partir de las siguientes células diploides: 1) células vegetativas de plantas maduras, 2) tejidos reproductores distintos al cigoto, 3) hipocotilos y cotiledones de embriones y plántulas jóvenes y, por último, 4) células de callos y de cultivos en suspensión.

En general, los principales factores que afectan la embriogénesis son el contenido de auxina en el medio y los compuestos nitrogenados presentes.

Por otro lado, con respecto a las modalidades de cultivo *in vitro* que existen, se pueden clasificar de acuerdo con el material o "explantado" utilizado en cultivos de callos, células en suspensión, meristemos, protoplastos, polen, anteras, etc.

a) Cultivo de callos.- Un callo es una masa amorfa de células parenquimatosas con distintos grados de diferenciación, pero sin un patrón de organización previsible. Su carácter funcional más importante es que puede desarrollar raíces y brotes normales, así como embriones que formen plántulas. A diferencia de los tumores vegetales, que crecen gracias a factores endógenos, los callos requieren el suministro de reguladores del crecimiento para desarrollarse. Normalmente, para que las células se desdiferencien es necesario complementar el medio con una elevada concentración de auxinas y una baja cantidad de citocininas.

Los callos suelen presentar distintas apariencias: verdes o amarillos (sin clorofila), duros y compactos o fácilmente disgregables en pequeños fragmentos (friables), con pigmentación uniforme o por zonas, blandos, grandes o pequeños, etc.

Este tipo de cultivos puede iniciarse con células desdiferenciadas, por ejemplo, con un fragmento que provenga de otro callo, con células libres (en suspensión o protoplastos) o bien con células diferenciadas como las de cualquier "explante" (fragmentos de hojas, tallos, hipocotilos, polen, etc.).

b) Cultivo de células en suspensión.- En este caso, las células crecen en un medio líquido que permite, en comparación con los medios sólidos, un mayor intercambio de nutrientes y gases. Estos cultivos se inician con inóculos de callos friables, cuyas células se separan y filtran para individualizarse, o incluso con material diferenciado, como por ejemplo, fragmentos de hipocotilos, cotiledones, hojas, etc.

c) Cultivo de meristemos. - Los meristemos son conjuntos celulares que se dividen muy activamente y dan origen a los distintos tejidos vegetales. En muchas plantas dicotiledóneas se encuentran en la parte terminal superior (meristemo apical) y en cada una de las axilas donde se une el tallo con las ramas u hojas (yemas axilares). Los conductos por los que se mueven las distintas sustancias en el interior de la planta no llegan hasta ellos. Como los virus se diseminan a través de estos tejidos vasculares, normalmente los meristemos son las únicas partes del individuo libres de dichos microorganismos. En consecuencia, este cultivo es uno de los procedimientos más prácticos y eficientes para obtener plantas libres de virus y otros patógenos internos.

Los meristemos, junto con dos o más primordios foliares, se extraen con ayuda de un microscopio en condiciones de total asepsia y se cultivan en medios que generalmente tienen altas concentraciones de potasio, auxinas y citocininas (aunque los meristemos apicales pueden desarrollarse sin el suministro de fitohormonas externas).

También suelen cultivarse "regiones meristemáticas" de mayor tamaño, es decir, conjuntos de meristemos con gran parte de los tejidos circundantes: ápices, estacas y plantas enteras desprovistas de hojas y raíces.

d) Cultivo de protoplastos. - Los protoplastos corresponden a células sin pared ni materia intercelular que se obtienen de cultivos en suspensión, callos o "explantes" a los que se ha tratado enzimáticamente con macerocima y celulasa.

La utilidad de los protoplastos se pone de manifiesto en la formación de plantas híbridas por fusión de dos o más de ellos y

su posterior regeneración; en estudios de introducción de núcleos, plásmidos, ADN, bacterias, virus, etc.; en investigaciones sobre la formación de la pared y en la regeneración de plantas.

e) Cultivo de polen y anteras. - Este tipo de cultivo permite la obtención de plantas haploides, a través de fenómenos de formación de callos que pueden originar embriones somáticos, brotes y raíces.

En teoría, la mayor parte de las plantas puede cultivarse *in vitro* de cualquiera de estas maneras (Figura 1). En muchos casos, la tecnología que permite pasar de una a otra de estas formas de cultivo ya ha sido desarrollada, pero en muchos otros, como se verá más adelante (Cf. 2.1.5.), se tienen grandes dificultades para ello.

2.1.3. Medios de cultivo

Los diferentes medios para cultivar tejidos vegetales varían en los tipos de componentes orgánicos e inorgánicos y sus concentraciones. Su elección está determinada por los objetivos particulares del trabajo, el inóculo empleado y la especie o incluso la variedad de la planta estudiada. Entre los más comunes se encuentran los de White (1943, 1963), el de Gamborg o B₅, el de Heller (1953) y el de Murashige y Skoog (1962) (Tablas 1 y 2). De todos ellos destaca principalmente este último, muy difundido en la actualidad, cuyos principales componentes son macro y microelementos, azúcares, vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento vegetal. Todos estos factores tienen funciones

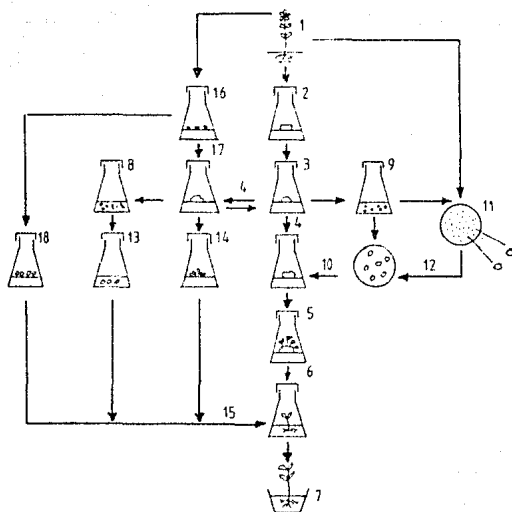


Figura 1. Planta madre de cultivo. 2. "Explante" cultivado asépticamente: hoja, tallo o meristemo. 3. Inducción de callo (masa de células desdiferenciadas) a partir de "explante". 4. Mantenimiento de callo. 5. Organogénesis somática (formación de tallos). 6. Organogénesis (enraizamiento). 7. Trasplante a tierra. 8. Células cultivadas en medio líquido (células en suspensión) 9. Clonación por plaqueo a partir de células en medio semisólido; cada célula da origen a un clon en forma de callo. 10. Aislamiento y subcultivo de los clones. 11. Cultivo de protoplastos producidos de células en suspensión o directamente de la planta madre. 12. Clonación por plaqueo a partir de protoplastos. 13. Embriogénesis somática a partir de células en suspensión. 14. Embriogénesis somática a partir de callos. 15. Germinación de los embriones. 16. Cultivo de órganos florales (anteras, microsporas) para producción de tejidos y plantas haploides. 17. Producción de callo a partir de anteras. 18. Embriogénesis por cultivo de microsporas (Tomada de M. Robert y V. Loyola. El cultivo de tejidos vegetales en México. México, 1985, p.25).

Componente	Concentración (mg/l)
Macroelementos	
NH ₄ NO ₃	1,650
KNO ₃	1,900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Fierro	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85
Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O o monohidratado	22.3 ó 17.0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Vitaminas	
Acido nicotínico	0.5
Piridoxina-HCl	0.5
Tiamina-HCl	0.1
Glicina	2.0
Mio-inositol	100.0
Sacarosa 3% (peso/volumen)	
Agar 0.7% (<i>ibidem</i>)	
pH 5.7 - 5.8	

Tabla 1. Principales componentes del medio de Murashige y Skoog (1962) y sus concentraciones. (Modificada de J. Dodds y L. Roberts. Experiments in plant tissue culture. Cambridge, 1982, p.30).

Componente	Concentración (mg/l)
Macroelementos	
KNO_3	62.5
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	250.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	62.5
KH_2PO_4	62.5

Tabla 2. Principales componentes de los macroelementos del medio de Knop (1861).

específicas que afectan las posibilidades de desarrollo del material vegetal considerado.

Los macro y microelementos se incluyen en el medio en forma de sales inorgánicas y corresponden a los minerales que una planta requiere para crecer. Los primeros se denominan así porque la planta los necesita en concentraciones relativamente elevadas. Los principales son el nitrógeno, azufre, magnesio, fósforo, potasio, calcio y cloro. Por otro lado, los microelementos son aquellos que el vegetal utiliza en cantidades sumamente reducidas: cobre, zinc, manganeso, hierro, boro, molibdato, yodo y cobalto. Cabe señalar que la pureza de los agentes químicos empleados en la elaboración del medio es importante, al igual que la del agar, pues pueden funcionar como una fuente adicional de sales minerales.

La adición de carbohidratos, comúnmente glucosa, sacarosa, maltosa o fructosa en concentraciones variables, tiene un efecto decisivo en el mantenimiento de la tonicidad del medio y en el suministro de carbono y energía para el inóculo, porque durante el período de cultivo el proceso fotosintético suele disminuir.

Las vitaminas, por su parte, se requieren en cantidades pequeñas y poseen funciones catalíticas en los sistemas enzimáticos de las plantas. Entre las más frecuentemente usadas están la tiamina (vitamina B₁), que algunos investigadores consideran la única esencial para el cultivo, el ácido nicotínico o niacina y la piridoxina (B₆), ambas capaces de estimular el crecimiento. En el proceso de esterilización por autoclave pueden degradarse, por lo que se recomienda filtrarlas y añadir las posteriormente al medio.

El único aminoácido que se utiliza con frecuencia es la glicina y a veces hidrolizado de caseína para enriquecer el medio con nitrógeno. Actualmente se han desechado los extractos naturales como peptona, extracto de levadura y malta, pero se ha incrementado el empleo de agua de coco y jugos y pulpas de frutas.

Los reguladores del crecimiento son compuestos químicos, naturales o sintéticos, que actúan a bajas concentraciones, activando o inhibiendo el metabolismo del vegetal y modificando así algunos de sus procesos vitales. Existen cinco tipos de reguladores conocidos: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. En general, solamente los tres primeros se consideran indispensables para el cultivo de tejidos vegetales.

La única auxina natural que se conoce es el ácido indolacético (AIA), pero hay otros compuestos sintéticos con actividad auxínica: los ácidos naftalenacético (ANA), indolbutírico (AIB), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) y 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5T). De hecho, estos últimos son generalmente más efectivos que el natural, quizá porque no son

oxidados tan rápidamente por enzimas de la planta, ni se degradan por acción de la luz y permanecen más tiempo ejerciendo sus efectos. Las auxinas promueven el aumento de volumen, el crecimiento del tejido en el eje longitudinal y el alargamiento celular. Además, aceleran la respiración e intervienen en la formación de raíces.

Las citocininas como la zeatina (natural), la benciladenina y la cinetina (sintéticas) se derivan de la base púrica adenina. Funcionan junto con el ácido indolacético en la inducción de la división celular. Se les conoce especialmente por su efecto sobre las vías de diferenciación de los cultivos y por la inducción del desarrollo de las yemas axilares.

Las giberelinas inicialmente se aislaron del hongo *Gibberella fujikuroi*, aunque se sabe que se presentan en angiospermas, gimnospermas, helechos, algas y otros hongos (excepto en bacterias). La más usada hasta ahora es el ácido giberélico o AG₃, dada su disponibilidad; pero existen más de cincuenta ácidos sintéticos de este tipo. Su efecto biológico se evidencia en el alargamiento del tallo, en el incremento del tamaño de las yemas laterales y en el de la planta en su totalidad.

Como puede intuirse, las posibilidades para combinar estos reguladores son inmensas. Los resultados que se obtengan dependerán en gran medida del tipo de regulador, su concentración y su combinación con otros.

2.1.4. Factores que afectan las respuestas de los tejidos vegetales en cultivo

Los principales factores que interfieren con las respuestas fisiológicas de los tejidos en cultivo son los factores biológicos, químicos, físicos y fisicoquímicos. Su control como condiciones paramétricas es determinante para intentar inducir las respuestas deseadas, logrando así el desarrollo exitoso de casi cualquier método de cultivo.

a) Factores biológicos.- Comprenden las características del material vivo empleado y entre ellos destacan los siguientes: 1) el tipo de planta usada, pues no todas las especies, variedades o incluso individuos responden igual; 2) las condiciones fisiológicas en que se halla la planta donadora, como nutrición, iluminación, edad, etc.; 3) el órgano o tejido de que se trate y su grado de diferenciación. No es lo mismo partir de fragmentos de hoja que de raíz o de tallo, que de pétalo o de antera. Asimismo, en una hoja, por ejemplo, puede ser que reaccionen mejor las células de un mesófilo joven que de uno de mayor edad o las de la nervadura central que las del parénquima, etc.; 4) las características físicas del material: su tamaño, forma y colocación en el medio y 5) la esterilidad del material, ya que la presencia de algunos microorganismos definitivamente impide el cultivo.

b) Factores químicos.- Además de los que ya fueron explicados anteriormente (Cf. 2.1.3.): los nutrientes, su combinación y concentración, la disponibilidad de sales minerales, vitaminas, carbohidratos, etc. y los reguladores del crecimiento, sus concentraciones y tipos, etc., es necesario considerar algunas sustancias nocivas que impiden el buen

desarrollo de los cultivos. Estos compuestos pueden ser producidos por el propio metabolismo del "explante" o por la degradación paulatina del medio nutritivo. Por tal motivo, hay que subcultivar el material periódicamente y así asegurar la calidad de los explantes mantenidos *in vitro*.

En ocasiones suelen usarse otros compuestos que también implican cambios químicos en el medio: antibióticos de distintos tipos y concentraciones, antioxidantes, inhibidores metabólicos, enzimas, inductores, etc.

c) Factores físicos.- Entre los factores físicos que cabe mencionar están los siguientes: 1) el espacio entre las plantas dentro del frasco de cultivo, pues éstas pueden llegar a interferir mecánicamente unas con otras, taparse la luz o competir por nutrientes y gases; 2) la temperatura del cuarto de cultivo que se mantiene constante o variable en un patrón regulado (a veces es conveniente bajarla durante las horas de oscuridad); 3) la luz en cuanto a calidad o mezcla de longitudes de onda, intensidad y fotoperíodo; 4) la densidad, el color y la transparencia del medio, (por ejemplo, hay plantas que no forman raíces si no se oscurece el sustrato); 5) el tipo de soporte (agar, gelrite o papel); 6) la aereación o superficie de contacto del cultivo con el aire y las características de éste (de hecho, las propias plantas van modificándolo durante el tiempo de incubación); y por último, 7) la humedad, que pocas veces se regula en las cámaras de cultivo, y que más bien está condicionada, junto con la aereación, por el grado en que se sellen los recipientes.

d) Factores fisicoquímicos. - Los dos más relevantes son el pH (grado de acidez o alcalinidad del medio) y la tonicidad, o sea, la disponibilidad de agua por la planta, regulada principalmente por la concentración de sales y azúcares en el medio.

2.1.5. Ventajas y problemas del cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos vegetales tiene un gran impacto como herramienta en la investigación básica de diversos aspectos bioquímicos, morfológicos, fisiológicos y de diferenciación celular vegetal. Además tiene muchas posibilidades de aplicación principalmente en el campo de la industria química y en el de la agricultura.

En la industria, el cultivo de callos y de células en suspensión permite la producción de sustancias naturales o metabolitos secundarios de importancia farmacéutica y comercial (colorantes, medicamentos, aromatizantes, etc.). Además, en el área agrícola, la técnica puede emplearse en la preservación de germoplasma, en el mejoramiento genético de especies y en la micropropagación de distintas variedades y cultivares.

La preservación de germoplasma implica el almacenamiento a bajas temperaturas de cultivos *in vitro* de especies vegetales en peligro de extinción, para asegurar su sobrevivencia.

El mejoramiento genético puede determinar la obtención de nuevas variedades tolerantes a salinidad y sequía o de variedades resistentes a hongos patógenos y plaguicidas. También puede permitir la creación, a mediano y largo plazo, de plantas que satisfagan intereses económicos o de investigación básica. Las

modificaciones genéticas se logran mediante técnicas de mutagénesis clásica, ingeniería genética, transformación de plantas o aprovechando la variación somaclonal que se presenta en distintos cultivos (células en suspensión y callos).

La propagación *in vitro* o micropropagación es una metodología relativamente sencilla y fácil de desarrollar, con el aliciente de que puede emplearse de manera inmediata en forma comercial para reproducir o multiplicar masivamente especies de relevancia económica para el hombre. Junto a este hecho, esta técnica tiene otras ventajas si se compara con los métodos tradicionales de multiplicación:

1) Permite la obtención de material vegetal libre de microorganismos patógenos internos y, por lo tanto, de una alta calidad fitosanitaria. Esto último se ve reforzado por el trabajo aséptico, que asegura la ausencia de bacterias y hongos durante las etapas en que la planta resulta más susceptible.

2) Un gran número de plantas se distribuye en un espacio relativamente reducido: a veces es posible lograr entre cuatro y seis mil plantas por metro cuadrado.

3) En plantas con problemas en la formación o germinación de las semillas, por ejemplo las orquídeas, la propagación se lleva a cabo mediante cultivo de tejidos.

4) Permite la producción masiva de ciertas especies. Por ejemplo, si una planta dada presenta cinco yemas y por métodos clásicos se obtienen otras cinco a los tres meses, la tasa de incremento sería: 1 planta -3 meses- 5 plantas -3 meses- 25 plantas -3 meses- 125 plantas -3 meses- 625 plantas en un año.

Con la micropropagación, esta tasa puede incrementarse de manera que de cada planta se obtengan veinte en los períodos de tres meses: 1 planta -3 meses- 20 plantas -3 meses- 400 plantas - 3 meses- 8,000 plantas -3 meses- 160,000 plantas en un año.

5) La posibilidad de producir rápidamente gran cantidad de plantas idénticas entre sí (clonación). Cuando se obtiene una variedad por fitomejoramiento, normalmente la tasa de propagación de este individuo por métodos clásicos es mucho más lenta que si se propaga masivamente *in vitro*. Esto mismo se aplica a plantas de ciclo lento de reproducción (frutales, agaves, especies forestales, etc.).

6) Muchas plantas producidas por esta técnica presentan el llamado "vigor *in vitro*", es decir, aumentan algunas de sus cualidades en cuanto a producción de estolones, capacidad de crecimiento, tamaño de los frutos, etc.

7) Permite la propagación durante todo el año, ya que las condiciones son artificiales y por ende controladas, independientemente de factores climáticos como fotoperíodo, época de lluvias, calidad de la luz, temperatura, etc.

8) Se ha trabajado intensamente con multitud de tipos de cultivos, por lo que se tienen establecidos muchos sistemas de micropropagación para plantas de interés agronómico (granos comestibles y forraje), hortícola (especies comestibles), industrial y ornamental, todos ellos importantes económicamente.

Ahora bien, junto a estas ventajas evidentes, la propagación *in vitro* presenta ciertos problemas que deben considerarse (alguno de los cuales se hace extensivo a la metodología en general):

1) Para empezar cualquier tipo de experimento es necesario tener cultivos estériles, lo cual puede ser un problema que retrase la obtención de resultados por contaminación y necrosis del tejido.

2) No existen recetas generalizables para manejar a todas las especies vegetales. No sólo cada especie, sino en ocasiones cada variedad requiere de una combinación particular de factores (Cf. 2.1.4.) en la que responde de forma óptima. Lograr esto último puede llevar varios años de investigación, si se considera que todos los factores son variables potenciales. Muchas veces la experiencia disminuye esta dificultad, pero también es cierto que el ensayo y el error juegan un papel preponderante.

Si desea aplicarse la micropropagación a nivel industrial, hay plantas que se trabajan con relativa facilidad, pues requieren metodologías sencillas y muy probadas, respuestas rápidas y ningún problema aparente. Sin embargo, algunas suponen dificultades técnicas y metodológicas a veces insuperables.

3) Pérdida de plantas por problemas en su adaptación a las condiciones ambientales, como consecuencia de haber permanecido en condiciones de esterilidad y en un medio con una humedad de casi el cien por ciento.

4) El hecho de obtener clones de una misma planta reduce la variabilidad natural. En otras palabras, aunque se presentan mutaciones, no hay recombinación genética, que es la mayor fuente de variación. Por lo tanto, todas las plantas clonadas responden de forma prácticamente idéntica a los cambios del medio, lo que podría acarrear problemas de sobrevivencia frente a condiciones adversas o enfermedades.

5) Falta de costumbre en la utilización de plantas en cultivos *in vitro* en algunos mercados, principalmente en los países en vías de desarrollo.

6) Por último, si se pretende aplicar industrialmente las investigaciones en el área debe considerarse el costo de producción como un problema decisivo. La micropropagación es una técnica costosa en cuanto a infraestructura, suministro de energía y aparatos de precisión. Se requiere también tiempo y dinero para lograr el entrenamiento y una alta eficiencia de los trabajadores que se encargan de ella. De hecho, muchas de las plantas herbáceas que han podido propagarse de esta manera son de fácil multiplicación por semillas y otros métodos tradicionales (esquejes, estacas, etc). Además, el país ya cuenta con la infraestructura necesaria para realizar los cultivos clásicos, junto con la experiencia de años de siembra, cosecha y transporte del material vegetal:

"Las experiencias de muchos autores indican que cuando las plantas pueden ser fácilmente propagadas por semilla no se justifica, en costo y en tiempo, el uso de técnicas *in vitro* para su incremento masivo" (26).

En conclusión, sólo conviene aplicar la técnica de propagación *in vitro* en especies cuya multiplicación sea deficiente o lenta (orquídeas, espárragos, fresas, cactáceas, etc.); en aquellas que su número se incremente por varios órdenes de magnitud con respecto al alcanzado mediante los sistemas tradicionales; en las de elevado valor económico (flores y plantas de ornato) y en las de alto valor individual (plantas

libres de patógenos, importantes agronómicamente o cultivares nuevos).

2.2. La fresa

2.2.1. Taxonomía (16)

Reino Plantae

División Espermatofita

Clase Magnoliópsida (Dicotiledóneas)

Subclase Rosidae

Orden Rosales

Familia Rosaceae

Género y especie *Fragaria ananassa*

2.2.2. Descripción botánica

Las plantas del Orden Rosales son generalmente leñosas con hojas variables y estípulas. Las flores son de tipo hipogino, epigino y con frecuencia perigino. Presentan numerosos estambres libres y ovarios con uno o muchos carpelos, libres o unidos. Sus frutos son variados y sus semillas casi siempre tienen endospermo.

Dentro del género *Fragaria* existen 46 especies distintas, que forman series poliploides (desde diploides hasta octoploides) con un número cromosómico básico igual a siete. La especie diploide más común es *F. vesca*, distribuida principalmente en las zonas templadas de Europa, Asia y América; mientras que la más usada para cultivos comerciales es *F. x ananassa*, planta octoploide con 56 cromosomas y cerca de 170 cultivares (17).

La fresa es una planta perenne, acaulescente por su corto tallo y más o menos pubescente. Sus hojas son basales y presentan estolones filiformes largos que salen de las axilas, los cuales pueden desarrollar raíces y formar nuevas plantas. **Pecíolos:** largos en su mayoría y acanalados arriba; **estípulas:** grandes, persistentes, escariosas y de color café; están adheridas a la base del pecíolo (adnatas) y recubren la región donde se originan las raíces; **hojas:** trifoliadas o desigualmente imparipinnadas; por ejemplo, con un par de folíolos laterales mucho más pequeños y situados abajo de los normales; **folíolos:** claramente dentados, enteros en la base y con forma más o menos de cuña; los folíolos laterales son oblicuos y los internos usualmente menores; **escapo:** la mayor parte de las veces casi tan largo como los pecíolos, cimoso y ramificado, con brácteas inferiores que presentan estípulas y una lámina más o menos ramificada; **pedicelos:** delgados, erectos cuando se encuentran en las flores, curvados cuando son del fruto; **flores:** poligamodioicas y muy raramente hermafroditas; las flores masculinas están formadas por cinco partes, son grandes y se hallan expuestas; las flores centrales se abren primero, tienen de seis a ocho partes y son mayores que las laterales; **lóbulos del cáliz:** forman un hipanto plano; en ocasiones existen otros lóbulos externos o brácteas de menor tamaño, pero en igual número que los internos; **estambres:** cerca de veinte o abortivos; **filamentos:** la mayoría más cortos que el receptáculo; **anteras:** oblongas; **receptáculo:** redondeado o cónico, con numerosos pistilos y estilos laterales; en la madurez el receptáculo se ensancha, se hace jugoso y sobre su superficie se distribuyen los frutos verdaderos o aquenios, que son pequeños,

secos y duros. A esta estructura agrandada o fruto falso se le da vulgarmente el nombre de "fresa". (17, 34).

2.2.3. Historia del cultivo

Las fresas se han conocido y cultivado desde la época de los romanos en el año 200 A.C. También fueron comunes en Gran Bretaña y Francia en la Edad Media y durante los siglos XV y XVI, cuando los herbolarios las utilizaban con fines medicinales, alimenticios y de ornato. Sin embargo, los frutos que se consumían eran pequeños, pues provenían de especies silvestres, muy probablemente de *F. vesca*.

Los grandes frutos que se producen en la actualidad se deben a un híbrido, *F. x ananassa*, que es el resultado de cruzar dos especies silvestres americanas: *F. chiloensis*, distribuida discontinuamente por la costa del Pacífico (Islas Aleutianas, California, Chile, etc.) y *F. virginiana* de América del Norte (de la costa este a las montañas Rocallosas y de Nuevo México a Alaska). La primera se cultivaba en Chile antes de la llegada de los españoles, se consumía fresca, seca o en vino y fue introducida en Europa en 1714. La otra fue llevada en forma de semillas en 1556, pero sus primeros cultivos datan de 1624. En estos años Francia era el principal centro productor de fresas y abastecía los mercados de París y Londres.

Hacia 1740, los agricultores y productores europeos se dieron cuenta de lo satisfactorio que resultaba, en cuanto al tamaño del fruto, crecer conjuntamente plantas de ambas especies. No obstante, parece que la producción de las primeras plantas de *F. x ananassa* fue accidental.

A lo largo de la historia del cultivo, los agricultores han logrado obtener muchas variedades de fresas adaptadas a distintos climas. Tradicionalmente esta planta no se propaga por semillas, sino de forma vegetativa mediante estolones.

Desde mediados del presente siglo, la producción de fresa ha ido aumentando constantemente. En la actualidad hay diversos países productores de este fruto, pero el desarrollo en el futuro quizá se dará en los países menos ricos, donde la mano de obra es bastante más barata. Cabe mencionar que al menos el 75% del costo de la producción se debe a este aspecto.

En el mundo se consumen cerca de dos millones de toneladas de fresas por año. Las presentaciones en mermeladas, jarabes y paquetes congelados han aumentado la popularidad del producto, pero el principal mercado sigue siendo el de fresa fresca.

2.2.4. El cultivo de fresa en México

Según datos de Lousteau de 1979 (5), México ocupa el segundo lugar en la producción de fresa en América, después de los Estados Unidos, y el undécimo con respecto a los países de Europa, Asia y América del Norte. La producción mexicana de fresa durante junio de 1972 y mayo del siguiente año fue de más de 100,000 toneladas; de las cuales el 12% se consumió como fresa fresca en el mercado nacional, el 17% se exportó de la misma manera, otro 58% se mandó congelada al exterior y el 13% restante se empleó para la preparación de mermeladas y jaleas (29). El principal mercado que consume la producción mexicana de fresa es el de Estados Unidos, pues las exportaciones hacia ese país

abarcan el 80% del volumen total de fruta fresca y un porcentaje importante de fresas procesadas (Reporte de SARH-DGEA, 1977).

Los principales estados productores son Guanajuato para abastecer el mercado interno y Michoacán, que en 1974 cubrió cerca de 90% de lo exportado (29). En dichos estados existen asociaciones locales que se encargan de regular la producción de los frutos. Por ejemplo, según información de su presidente, la Unión Regional de Productores de Fresa y Hortalizas del Valle de Zamora (U.R.P.F.H.V.Z.) en Michoacán reúne a 1,350 productores que siembran la superficie máxima total permitida. Este organismo importa ocho millones de plantas de Red Bluff, California, que se usan como planta "madre". El costo de cada mil plantas es de treinta y cinco dólares (Entrevista con el presidente de la Unión michoacana, marzo de 1988).

En este punto es necesario hacer un paréntesis para explicar el camino que sigue una planta de fresa producida por micropropagación. Un inóculo colocado en el medio de Boxus (5), por ejemplo, genera en seis u ocho semanas una masa de veinte yemas más o menos desarrolladas. Una vez separadas, estas plantas tardan entre cuatro y seis semanas en enraizar, para entonces ser trasplantadas a tierra y adecuarse a las nuevas condiciones de cultivo. A continuación, las plantas se colocan en viveros o invernaderos donde se multiplican entre 50 y 100 veces mediante crecimiento de estolones (Comunicación personal del Ing. Luis Granada). Este proceso, junto con la propagación *in vitro*, lo llevan a cabo en Estados Unidos técnicos y viveristas especializados. Las plantas que resultan son las que importan los productores de la Unión michoacana. El problema de utilizar

plantas que ya han pasado por varias etapas de propagación en vivero es que no puede garantizarse su calidad fitosanitaria.

Cuando llegan a México, las plantas se siembran en 400 hectáreas de viveros en la zona de Tanganzicuaró, en los meses de diciembre a enero. De cada planta americana se genera un promedio de 35 plantas en siete meses. Esta nueva generación es la que se reparte entre los agricultores para que se inicie la producción de frutos (Figura 2) y debe ser suficiente para cubrir la máxima superficie que puede sembrarse con fresa en el área de influencia de la Unión, unas 2,800 has. La densidad promedio de siembra en la región es de 100,000 plantas/ha, lo que da un total de 280'000,000 de plantas productoras por año. Los huertos se establecen a fines de julio o principios de agosto y se empiezan a cosechar en noviembre. El cierre de la cosecha se hace cuando comienzan las lluvias. En la Unión se tiene reportado un rendimiento medio de 25 ton/ha y un costo de producción de \$6'000,000/ha. Del total de la producción un 80% se destina para preparar fresas congeladas de exportación, un 15% se exporta como fresa fresca y el 5% restante permanece en el mercado nacional (Entrevista con el presidente de la Unión michoacana, marzo de 1988).

2.3. El cultivo de tejidos de fresa

2.3.1. Antecedentes

El cultivo de tejidos de fresa se inició durante los años sesenta, pero su máximo desarrollo ocurrió diez años después con los experimentos de multiplicación clonal masiva (Boxus, 1974), los de preservación de germoplasma (Damiano, 1979), los intentos

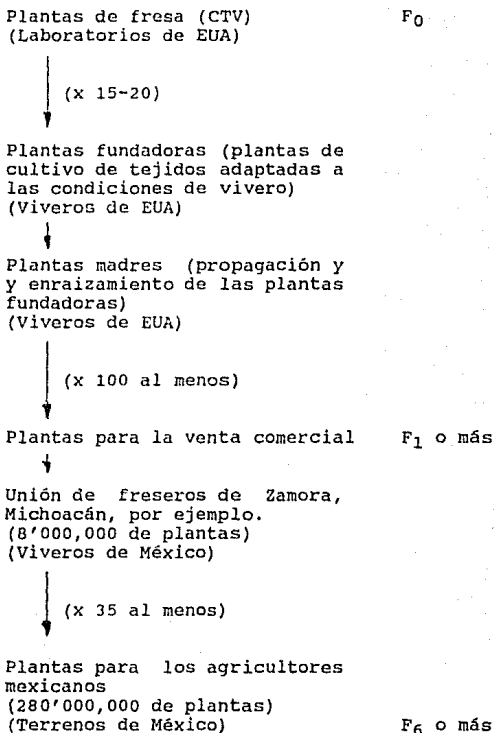


Figura 2. Esquema teórico de producción de plantas de fresa. Las plantas "F₁" son las que Estados Unidos aparentemente vende a México. Pero no siempre es posible conseguir las en esta etapa, sino de varias generaciones de propagación vegetativa en vivero. La siguiente etapa de propagación se lleva a cabo en México, por los socios de las uniones regionales, para luego ser vendida a los agricultores que crecen el fruto (Información obtenida en la Unión de freseros de Zamora, Michoacán, abril y marzo, 1988).

fallidos para producir plantas cuyo número cromosómico fuera menor y con el empleo de la técnica en el mejoramiento fitosanitario de plantas para los agricultores (1, 5).

La fresa presenta una multitud de virus, micoplasmas y otros parásitos que afectan el rendimiento comercial de la planta. En la literatura se reportan 54 tipos de virus de la fresa que pueden causar una disminución del 20 al 80% de la producción de frutos y del 50% de estolones en algunas variedades. Por su parte, los hongos como *Phytophthora fragariae*, *Ph. cactorum* y *Verticillium* sp. son más dañinos que los virus y ocasionan enfermedades devastadoras. Hasta este momento, el problema no ha podido solucionarse utilizando fungicidas. Aunado a los virus y hongos, las fresas tienen otro tipo de pestes que se hacen evidentes en ciertos períodos del año, como tarsonémidos (*Steneotarsonemus*), nemátodos (*Aphelenoides* y *Ditylenchus*) y varias clases de insectos (coleópteros, lepidópteros, homópteros, etc.). Todas ellas afectan en mayor o menor grado la capacidad productiva de las plantas. El control químico de estos parásitos ha probado tener un efecto limitado, además de resultar altamente tóxico para el hombre.

El cultivo de tejidos de fresa resulta una herramienta de primer orden para resolver estos problemas, pues ayuda a evitar el ataque de parásitos externos en los primeros estados de desarrollo de las plantas, cuando son más susceptibles. Además permite eliminar la presencia de microorganismos internos empleando varios métodos: cultivo de meristemos apicales y propagación de yemas axilares de plantas silvestres y tratadas

con calor, y cultivo de los extremos de los estolones (entre 3 y 5 mm) en medios estériles.

Los tres se utilizan con mucha frecuencia, aunque la colocación de plantas en temperaturas de 30 y 35°C durante varios días (control térmico de los virus o termoterapia) suele ser optativo. Algunos autores siguen realizándolo como una primera etapa antes de extraer y cultivar los meristemas. Otros prefieren únicamente abocarse a la búsqueda de un medio de cultivo adecuado para el desarrollo de los meristemas y a definir el tamaño óptimo del inóculo. Este aspecto es determinante en el cultivo de la fresa, pues entre más grande sea el meristemo, mayor resultará la sobrevivencia, pero menor el porcentaje de eliminación de patógenos internos.

2.3.2. La experiencia de Boxus (1, 2, 5, 6)

Durante 1974 Philippe Boxus y su equipo desarrollaron en Gembloux, Bélgica, un método de micropropagación de fresa que se aplica con éxito a nivel industrial. El principio básico de dicha metodología es extremadamente simple: el crecimiento de las yemas axilares se induce por la presencia de citocinina en el medio y su eliminación posterior permite la aparición de hojas maduras y raíces.

Boxus usa como material inicial meristemas de estolones jóvenes y no el apical, porque resultan más fáciles de extraer, debido a la ausencia de vellosidades, y porque aseguran una menor contaminación microbiana interna. Los estolones se desinfectan previamente durante dos minutos en alcohol (94°), quince minutos en una solución de hipoclorito de calcio (5%) y se enjuagan con

agua destilada estéril. Los meristemos y los primordios foliares, extraídos con la ayuda de un microscopio, se colocan en un medio básico compuesto por los macroelementos de Knop (Tabla 2), los microelementos y la mezcla de vitaminas de Murashige y Skoog (Tabla 1) más ácido indolbutírico (1 mg/l), glucosa (4%) y agar (0.7%). Para efectuar el cultivo de meristemos de fresa se añade benciladenina (0.1 mg/l) a este medio básico. Después de tres o cuatro semanas, los ápices aislados forman pequeñas plántulas de uno o dos centímetros de longitud, con pocas hojas y algunas raíces.

Para llevar a cabo la micropropagación o multiplicación acelerada, las plántulas de fresa que resultaron en el cultivo anterior se transfieren una por una a frascos con medio básico, complementado esta vez con benciladenina (1 mg/l) y ácido giberélico (0.1 mg/l). A esta primera etapa se le conoce como fase de proliferación.

Los primeros brotes aparecen tres o cuatro semanas más tarde, crecen rápidamente y unos cuantos días después, la plántula inicial se convierte en una masa de brotes. Después de dos meses, cada conjunto de brotes contiene entre 15 y 25 plántulas con hojas unifoliadas y sin raíces, que deben ser individualizadas.

En este momento del proceso pueden hacerse dos cosas: seguir con la fase de proliferación, poniendo una o más plántulas en el mismo medio recién preparado, o bien pasar a la fase de enraizamiento. Dicha etapa implica la separación de cada plántula y su colocación en el medio básico, sin benciladenina ni ácido giberélico, para promover el crecimiento de raíces en

aproximadamente doce días. Las plantas jóvenes con raíces pueden transferirse a suelo después de cuatro o seis semanas.

Las condiciones de incubación de los cuartos de cultivo que propone son las siguientes: luz fluorescente de 40W (tres tubos por metro), fotoperíodo de 16 horas/día y 8 horas/noche, temperatura de 23 a 25°C y humedad del ambiente sin controlar. Para distribuir la producción uniformemente durante todo el año, las plantas pueden almacenarse en cuartos fríos (2°C) y en oscuridad total. En estas condiciones los cultivos resisten ocho meses o más, aunque después de dicho lapso deben pasar un par de veces por medio fresco de enraizamiento, para recuperar su capacidad de generar estolones.

El paso a suelo es relativamente fácil de lograr, con un 95 ó 100% de éxito. Las plántulas se extraen del agar y se lavan sus raíces para eliminar restos de este producto. Se colocan en un sustrato especial y se mantienen debajo de un plástico transparente durante varias semanas, para conservar una humedad relativa alta. Después de cinco o seis semanas las plantas pueden pasarse al campo de cultivo, pues presentan hojas trifoliadas y un sistema radical bien desarrollado.

Este autor reporta resultados muy prometedores cuando efectúa este proceso de propagación a nivel industrial. Tiene un 74% de éxito con el cultivo de meristemas, una pérdida del 7% por contaminación bacteriana y un 100% de eliminación viral sin someter las plantas al tratamiento térmico. Además, aunque las diferencias entre cultivares pueden afectar las posibilidades de éxito, los 253 probados en Gembloux han dado resultados positivos. Todos se comportan de distinta manera, por ejemplo la

variedad Surprise des Halles siempre responde en el 85 y 100% de los casos, mientras que Gorella es la más difícil de cultivar, con una eficiencia del 15 ó 20%. Otras variedades trabajadas en Bélgica son Bemaril, Rabunda, Domaril, Fanil, Serga gigana, Goupil, Gembloux, Red Gauntlet, etc.

Para iniciar el proceso industrial de propagación, Boxus utiliza germoplasma almacenado en oscuridad y frío en frascos sellados con plástico; prepara el medio en una máquina que permite ajustar el pH, calentar y verter 40 litros de medio en 250 frascos por hora; esteriliza el medio una vez añadidos todos los componentes; usa la misma receta para cualquier variedad de fresa; coloca quince explantes por cada frasco de 500 ml con 150 ml de medio y un mes después, reparte las masas de brotes en cinco frascos nuevos.

Otro aspecto importante considerado por el grupo belga es el comportamiento en el campo de las plantas micropropagadas. En cuanto a la producción de frutos, se ha observado que no hay diferencias significativas entre el peso y la calidad de los mismos de variedades propagadas *in vitro* y de forma tradicional, aunque en ciertos casos sí se presentan algunos de menor tamaño. La producción de estolones se incrementa considerablemente, quizá como una manifestación del estado juvenil de las plantas producidas *in vitro*. Por último, el comportamiento genético de estas plantas es sumamente estable, pues se observan muy pocas mutaciones. Se han reportado mutaciones somáticas en clorofila (con una frecuencia de 1 en 10,000), lo que acarrea la aparición de una o dos hojas amarillas en toda la planta; otras que causan la presencia simultánea de una fase generativa (floración) y una

vegetativa (producción de estolones); otras más que disminuyen el tamaño de las hojas, etc. Sin embargo, su frecuencia es baja y en ocasiones también se manifiestan en plantas propagadas tradicionalmente.

2.3.3. La experiencia en Chapingo (12)

En el Colegio de Postgraduados de Chapingo se desarrolló, en 1985, el sistema de micropropagación de fresa para las variedades Tioga, Fresno, Solana, Pájaro y San Agustín. La metodología empleada está basada en el mismo principio básico que la de Boxus: aislamiento y cultivo de meristemos, multiplicación masiva de plántulas y enraizamiento de éstas. Sin embargo, presenta varias diferencias principalmente en la composición de los medios nutritivos.

El proceso de obtención y limpieza de meristemos es prácticamente igual al de Boxus, pero para su crecimiento y posterior multiplicación usan un solo medio con macro y microelementos de Murashige y Skoog (Tabla 1), tiamina (0.4 mg/l), i-inositol (100 mg/l), sacarosa (0.3%), ácido indolacético (1 mg/l), cinetina (1 mg/l), agar (0.8%) y pH de 5.7. Para el enraizamiento suprimen los dos reguladores del crecimiento y reducen las sales en un 50%.

Las condiciones de incubación también se modifican ligeramente, pues sus cuartos tienen temperaturas de 26 ó 28°C y alternan una intensidad luminosa de 1,000 luxes para los meristemos y 3,000 para las etapas de multiplicación y enraizamiento. El fotoperíodo es siempre el mismo: 16 horas/día.

Para el paso de las plántulas enraizadas a tierra, lavan las raíces con un agente fungicida (captán-50, 0.2%) y transfieren a un suelo estéril compuesto de arena, tierra de hoja y agrolita en proporciones idénticas. El riego por nebulización es de diez segundos cada media hora la primera semana, cinco segundos la segunda y finalmente riego normal. La sombra empleada es de 50% y el fotoperíodo de 12 a 14 horas/día. Con estas condiciones alcanzan una sobrevivencia del 100% de las plantas pasadas a suelo.

3. JUSTIFICACION DEL TRABAJO Y OBJETIVO

El trabajo que aquí se presenta tiene importancia dentro de un proyecto más general de transferencia tecnológica de laboratorios de investigación hacia la iniciativa privada. En el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de Irapuato existía la necesidad de desarrollar el sistema de propagación *in vitro* de plantas de fresa para obtener un medio nutritivo que resultara barato y eficaz, junto con el empleo de un método de trabajo que asegurara la calidad de las plantas producidas. Para lograr esto, se recurrió a las dos experiencias previas que se conocían en el área: la del Dr. Philippe Boxus en Bélgica y la de un grupo del Colegio de Postgraduados en Chapingo, México. Esta tesis representa la primera aproximación a dicho sistema biotecnológico, usando dos variedades de fresa importantes de Zamora, Michoacán, y una de Irapuato, Guanajuato, con el siguiente objetivo general:

Comparar la eficiencia de distintos medios de propagación y enraizamiento para las variedades de fresa Fern, Douglas y Tioga, así como sus costos de producción en el laboratorio, para definir el más efectivo y barato.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Material vegetativo

Para iniciar los experimentos de micropropagación se utilizaron plantas de fresa *in vitro*, previamente establecidas mediante cultivo de meristemas, de las variedades Tioga, Fern y Douglas. La primera de ellas fue comprada al Ing. Luis Granada Carreto, del Centro Demostrativo y de Capacitación Campesina-Tezoyuca del FIRA-Banco de México; y las otras dos fueron proporcionadas por el Ing. Rafael Ramírez Malagón, de la Escuela de Agronomía y Zootecnia de la Universidad de Guanajuato.

4.2. Procesamiento del material vegetativo

Las plantas de las tres variedades de fresa se sembraron en el medio de Murashige y Skoog (MS) (23) sin reguladores del crecimiento y con 3% de sacarosa. En este medio se les dejó crecer durante cuatro semanas, con la idea de comenzar la experimentación con plantas que hubieran estado en condiciones de incubación similares. Una vez transcurrido este tiempo, las plantas se extrajeron en condiciones de asepsia y se les cortaron hojas y raíces, para generar inóculos de 0.5 y 1 cm de longitud.

4.3. Experimentos preliminares

Durante los primeros seis meses de este proyecto se trabajó sin un diseño estadístico particular, para conocer el comportamiento general del sistema de micropropagación de fresa y probar varios de los aspectos detallados en la introducción (Cf. 2.1.4.). Se llevaron a cabo experimentos modificando alguno de

los siguientes factores: 1) frascos de 125, 150 y 350 ml de capacidad, con 25, 30 y 50 ml de medio respectivamente; 2) lámparas de 39W de tipo "blanco frío" y "luz de día"; 3) intensidades luminosas entre 1,000 y 5,000 luxes; 4) luz continua y fotoperiodo de 16 horas/día; 5) intervalos de temperatura entre 24 y 32°C; f) plástico para sellar los frascos o no; 6) agar en dos concentraciones (7 y 8%) y gelrite (2%) para experimentos de propagación y enraizamiento, 7) dos tipos de carbohidratos (sacarosa y azúcar comercial) y por último, 8) carbón activado (1%) mezclado con ácido indolacético (2 mg/l) para estimular la formación de raíces.

En estas primeras etapas experimentales también se probaron los medios de propagación I, III y IV (Cf. 4.4.1.), sin llevar a cabo ninguna cuantificación estricta, lo cual permitió planear la estrategia de investigación posterior.

4.4. Medios de cultivo

4.4.1. Composición y preparación

Todos los medios de cultivo se prepararon aforando las sales y demás constituyentes en el 50% del volumen final requerido y ajustando el pH a 5.7; en la otra mitad se fundió el agar y se mezcló con la solución anterior. Entonces se distribuyeron a razón de 25 ml en frascos de 125 ml que se cubrieron con tapones de plástico. Por último se esterilizaron en autoclave a 121°C durante veinte minutos.

Los cinco medios empleados en la etapa de multiplicación, que de ahora en adelante se designarán como "tratamientos de propagación", fueron los siguientes:

I. Medio constituido por macroelementos de Knop; micronutrientes, fierro y vitaminas de MS; glucosa (4%); 1 mg/l de ácido indolbutírico (AIB); 1 mg/l de bencilaminopurina (BAP) y 0.1 mg/l de ácido giberélico (AG₃) y agar (0.7%) (1, 5).

II. Medio preparado en el laboratorio.

III. Medio con macronutrientes, microelementos y fierro de MS; tiamina-HCl (0.4 mg/l); i-inositol (100 mg/l); sacarosa (3%); 1 mg/l de ácido indolacético (AIA); 1 mg/l de cinetina (CIN) y agar (0.8%) (12).

IV. Medio del laboratorio.

V. Medio del laboratorio.

Los medios nutritivos que se usaron en las etapas de pre-enraizamiento y de enraizamiento fueron los siguientes:

VI. Medio con macroelementos de Knop; micronutrientes, fierro y vitaminas de MS; glucosa (4%); AIB (1 mg/l) y agar (7%) (5).

VII. Medio con la misma composición que el anterior, pero sin regulador del crecimiento ni glucosa, sino azúcar comercial (3%).

VIII. Medio con sales inorgánicas de MS al 50%; tiamina-HCl, inositol y azúcar como en la propagación; agar (0.8%) (12).

IX. Medio con los mismos elementos que el IV, pero sin reguladores del crecimiento.

X. Medio de igual composición que el V, excepto los reguladores del crecimiento.

XI. Medio con la misma composición que el V, pero con 2% de azúcar comercial.

Los medios numerados del VI al IX y el XI se llamarán los "tratamientos de pre- y enraizamiento", mientras que el X se considerará el "tratamiento control" de estas etapas.

4.4.2. Costos

Para obtener el costo en dólares de los distintos componentes del medio nutritivo para 500, 1,000, 5,000 y 10,000 litros, se calculó la cantidad necesaria de los distintos elementos: sales, azúcares, gelificantes, reguladores del crecimiento, etc. Luego se estableció el pedido mínimo indispensable para cubrir cada uno de los requerimientos y se obtuvo el costo de cada pedido, utilizando el catálogo de Sigma de 1988 y el de Merck de 1985 (este último sólo sirvió para conocer el precio del gelrite). En el caso de un litro de medio, se extrapoló el precio de las cantidades necesarias en su elaboración, usando como unidad de comparación la menor cantidad de producto que estuviera a la venta.

4.5. Diseño experimental

Los inóculos de fresa se sembraron en los distintos medios que estimulan el desarrollo de las yemas axilares (I, II, III, IV y V). Por cada tratamiento de propagación se colocaron doce inóculos en seis frascos. Esto se repitió para las tres variedades de fresa consideradas.

Los "explantes" se incubaron entre nueve y once semanas en las cámaras de crecimiento, con resiembras a medios frescos después de veinte o veinticinco días de cultivo. Pasado este tiempo de propagación, cada conjunto de brotes se dividió en

cuatro y se sembró en los medios de pre-enraizamiento, en los cuales permanecieron otros veinte o veinticinco días en las mismas condiciones de incubación. Los brotes generados en el medio I se subcultivaron en los medios VI y X; los del medio II, en los denominados VII y X; los del III, en el VIII y X; los del IV, en el IX y X, y por último, los del V pasaron a pre-enraizamiento en el XI y X. Una vez transcurrido este período, los brotes se individualizaron y se volvieron a sembrar en los mismos medios de la etapa anterior, donde permanecieron veinte días más, antes de ser trasplantados a suelo como plántulas completas o empleados para un nuevo ciclo de micropropagación (Figura 3).

Los resultados de propagación se examinaron estadísticamente mediante "análisis de varianza simple" y "multifactorial", utilizando intervalos de confianza del 95%.

4.6. Condiciones del cuarto de cultivo

Los inóculos fueron incubados a 25-26°C, con un fotoperíodo de 16 horas luz y una intensidad luminosa de 4,000 luxes. Se usaron lámparas de tipo "blanco frío" de 215W. La humedad del cuarto no fue controlada, pero los frascos se sellaron con plástico.

4.7. Almacenamiento en cuartos fríos

Con el objeto de distribuir homogéneamente la producción de plántulas de fresa conviene almacenarlas en cuartos con temperaturas de 2 ó 4°C y en oscuridad total. En teoría, cualquier estadio de la propagación puede guardarse en frío

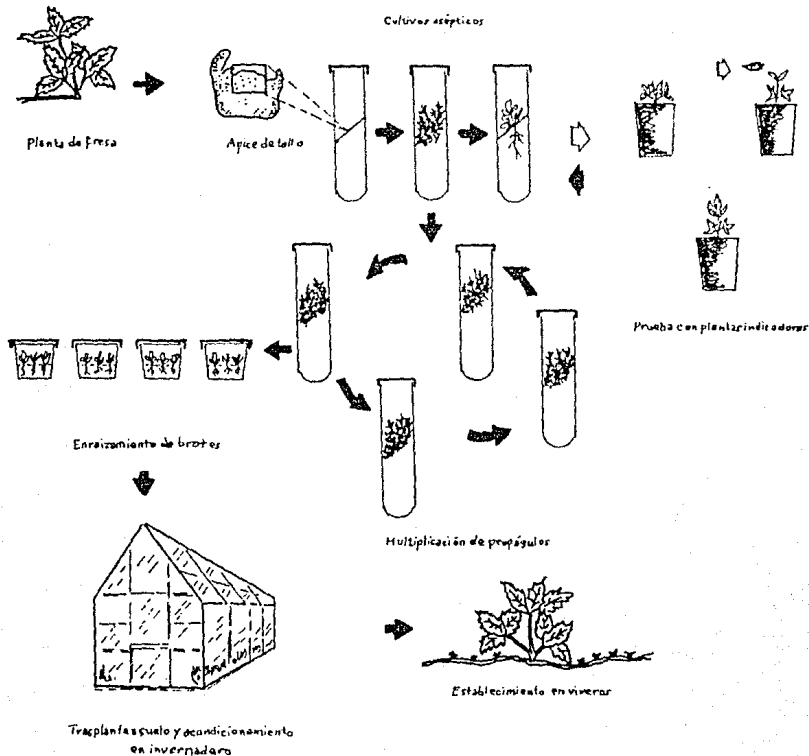


Figura 3. Esquema general de la propagación *in vitro* de plantas de fresa (Tomado de L. Granada et al. Producción *in vitro* de plantas de fresa. México, 1987, p. 6).

durante varios meses (5). En este caso, las plántulas de fresa se almacenaron en la etapa de enraizamiento. Los frascos de cultivo se sellaron con una doble capa de plástico, para evitar una desecación excesiva del medio, y se embolsaron en grupos de veinte. Estos paquetes se apilaron en el cuarto frío del laboratorio y no volvieron a tocarse hasta pasados seis y doce meses, cuando fue necesario ocupar el material en un nuevo ciclo de propagación. Las plantas recién sacadas del cuarto frío se procesaron exactamente igual que las no refrigeradas: se les cortaron hojas y raíces y se sembraron en MS, donde permanecieron en recuperación durante seis semanas, con una resiembra a medio fresco a la mitad de dicho lapso.

4.8. Adaptación de las microplantas en suelo

Después de veinte días de enraizamiento se llevó a cabo la transferencia y el establecimiento en suelo de las plántulas de fresa. Estas se sacaron de los frascos de cultivo directamente con los dedos, una vez disgregado el agar que las rodeaba. Esto se hizo con el objeto de no romper las delicadas raíces de las plantas. A continuación, las raíces se lavaron en un recipiente con agua, para retirar los restos de gelatina nutritiva, en la que fácilmente podrían crecer bacterias y hongos.

Las plántulas se sembraron en vasos de plástico de 10 cm de altura y con tres perforaciones en la base. El sustrato que se empleó fue una mezcla compuesta de tierra de hoja y vermiculita en proporciones iguales. En este sustrato se hizo un agujero a todo lo largo del vaso, para permitir la colocación de las raíces.

Como en los cultivos *in vitro* las plántulas tienen una humedad de cerca del 100% y se hallan protegidas de corrientes de aire, cuando se sacaron al medio ambiente fue necesario taparlas con frascos transparentes de 350 ml, para impedir su desecación. Transcurridas cuatro semanas, las plantas estaban listas para ser enviadas a los campos de cultivo.

5. RESULTADOS

5.1. Experimentos preliminares

La información obtenida en esta primera etapa experimental es el resultado de una observación cuidadosa de las plantas de fresa en cultivo, más que de una cuantificación estricta. A continuación se detallan los aspectos más relevantes encontrados.

El tipo de luz ("blanco frío", "luz de día" y sus combinaciones), la intensidad (1,000, 3,000 y 5,000 luxes) y el fotoperíodo (luz continua vs 16 horas/luz) son factores que no parecen interferir con el desarrollo de las fresas, dentro de los intervalos probados. En todas estas condiciones experimentales las fresas tenían una apariencia sana: color verde intenso, láminas foliares bien desarrolladas y raíces de 7 a 10 cm de longitud después de un mes de cultivo. Algo similar ocurrió con las dos concentraciones de agar, el tipo de carbohidrato (sacarosa, azúcar comercial), el carbón activado y la auxina empleada para enraizar. Estos dos últimos compuestos no resultaron indispensables para estimular la aparición ni el crecimiento de raíces en las fresas. La única diferencia notable que se presentó entre las raíces de ambas condiciones fue el color: las de plantas crecidas en medios con carbón activado eran blancas y las de medios transparentes, verdosas o pardas, lo cual no parece afectar su fisiología.

Por su parte, las temperaturas de las dos cámaras de incubación disponibles en el laboratorio (24-26 y 25-32°C) alteraron más las características físicas de los medios que la calidad de las plantas. Pero esto debe tomarse en cuenta, porque

ambos factores terminan por equipararse a corto o mediano plazo. Los frascos del cuarto más caliente se deshidrataban con mucha rapidez, lo que obligaba a efectuar resiembras frecuentes, con riesgo de aumentar el índice de contaminación. Por lo tanto, las fresas se incubaron en el cuarto de menor temperatura. En cierta medida relacionado con este factor, el uso de plástico para sellar también funciona como protector contra la desecación, además de impedir la entrada de esporas contaminantes que crecen en las paredes de los frascos o en los bordes del medio.

Los dos aspectos que más afectaron el desarrollo de las fresas fueron el tamaño de los frascos de cultivo y el empleo de gelrite como agente gelificante. Los mejores recipientes resultaron los de mayor capacidad (350 ml), pues propiciaron la obtención de plantas de 6 ó 7 cm de longitud en un mes; seguidos de los otros dos intermedios (150 y 125 ml) que contenían plantas de 2-3 y 3-4 cm. Sin embargo, las plantas fueron sembradas en estos frascos y no en los primeros, contemplando la posibilidad de aplicar la técnica a nivel industrial y reducir el costo de producción por el uso de menores cantidades de medios nutritivos. Para finalizar, el gelrite no resultó una buena alternativa en el caso de la fresa, aunque reduce el costo del medio en un 30% (Cf. 5.2.), pues la calidad de las plantas disminuyó considerablemente. En el caso de los experimentos de propagación, las plantas tomaron un color amarillento y la aparición de brotes no fue tan evidente como en los medios con agar. En los de enraizamiento, las plantas sufrieron el proceso llamado vitrificación o adquisición de una apariencia cristalina, que

disminuye su calidad. Este fenómeno nunca se presentó en los medios solidificados con agar.

Con respecto a las primeras tentativas para probar la eficacia de los medios I, III y IV, desde un comienzo pudo intuirse su comportamiento, a través de la observación de las plantas que se generaron. El IV resultó el mejor, seguido del I y del III en ese orden (Cf. 5.3.2.).

5.2. Costo de los medios

Los costos de los principales componentes de los medios nutritivos se resumen en las primeras tablas de esta sección (Tablas 3 y 4), así como los de algunos medios que pueden emplearse en la propagación y enraizamiento de plantas de fresa (Tablas 5 y 6).

El agar y la glucosa son los productos más caros, pues abarcan entre el 20 y el 80% del costo final del medio, dependiendo de este mismo y del volumen preparado. Les siguen la sacarosa (15 a 30%) y los macroelementos de MS (15 a 25%). Estos valores pueden reducirse en un 10, 15 ó 25% si se usa la mitad de macroelementos de MS, los de Knop o azúcar comercial respectivamente. Los demás compuestos no representan un gasto excesivo, porque micronutrientes, vitaminas, fierro y "pH" juntos fluctúan entre el uno y el 30%, mientras que los reguladores del crecimiento lo hacen en un 5 ó 10% del costo total.

Elementos	1l	500l	1,000l	5,000l	10,000l
Macros MS	0.1206	75.10	116.10	453.30	880.40
Macros MS (50%)	0.6030	54.10	75.10	235.75	453.30
Macros Knop	0.0260	42.05	48.65	116.25	198.95
Micros MS	0.0019	58.10	58.10	58.10	62.20
FeEDTA	0.0032	13.60	13.60	19.95	29.20
Vit. ino.	0.0149	26.90	31.60	58.45	88.30
Tiamina-HCl (0.4 mg/l)	0.0003	4.25	4.25	4.25	4.25
Inositol (100 mg/l)	0.0142	7.30	12.00	38.85	68.70
Agar (0.6%)	0.5100	126.00	208.35	998.10	1996.20
(0.7%)	0.5950	151.20	250.35	1164.45	2328.90
(0.8%)	0.6800	166.35	292.35	1330.80	2661.60
Gelrite (0.2%)	0.1233	70.00	140.00	600.00	1150.00
Azúcar (1%)	0.0050	2.50	5.00	25.00	50.00
(2%)	0.0100	5.00	10.00	50.00	100.00
(3%)	0.0150	7.50	15.00	75.00	150.00
Sacarosa Sigma (1%)	0.0850	20.95	37.25	186.25	372.50
(2%)	0.1700	37.25	74.50	372.50	745.00
(3%)	0.2550	58.20	111.75	558.75	1117.50
Glucosa (4%)	2.5000	63.50	107.40	508.00	1016.00
KOH (1N)	0.0051	5.65	5.65	9.10	9.10
Carbón act. (0.05%)	0.0090	8.95	8.95	28.20	56.40
(0.10%)	0.0179	8.95	17.90	56.40	112.80

Tabla 3. Costo en dólares de sales minerales, fuentes de carbono, vitaminas, gelificantes y otros productos para distintos volúmenes de medio de cultivo.

Reguladores (mg/l)	11	5001	1,0001	5,0001	10,0001
Auxinas					
AIA (0.5)	0.0006	5.90	5.90	5.90	5.90
(1.0)	0.0012	5.90	5.90	5.90	11.80
(1.5)	0.0018	5.90	5.90	11.80	16.70
(2.0)	0.0024	5.90	5.90	11.80	16.70
AIB (0.5)	0.0020	4.00	4.00	12.00	13.05
(1.0)	0.0040	4.00	4.00	13.05	26.10
(1.5)	0.0060	4.00	8.00	26.10	36.75
(2.0)	0.0080	4.00	8.00	26.10	36.75
ANA (0.5)	0.0001	7.40	7.40	7.40	7.40
(1.0)	0.0003	7.40	7.40	7.40	7.40
(1.5)	0.0004	7.40	7.40	7.40	7.40
(2.0)	0.0006	7.40	7.40	7.40	7.40
Citocininas					
BAP (0.5)	0.0198	6.10	6.10	21.50	29.55
(1.0)	0.0395	6.10	7.70	29.55	59.10
(1.5)	0.0592	7.70	13.80	51.05	88.65
(2.0)	0.0790	7.70	15.40	59.10	118.20
CIN (0.5)	0.0106	10.60	10.60	44.40	59.35
(1.0)	0.0212	10.60	16.90	59.35	118.70
(1.5)	0.0318	16.90	27.50	103.75	178.05
(2.0)	0.0424	16.90	33.80	118.70	234.50
Giberelinas					
AG ₃ (0.05)	0.0010	10.10	10.10	10.10	10.10
(0.10)	0.0020	10.10	10.10	10.10	15.55
(0.15)	0.0030	10.10	10.10	15.55	25.65
(0.20)	0.0040	10.10	10.10	15.55	31.10

Tabla 4. Costo en dólares de algunos reguladores del crecimiento vegetal: AIA, ácido indolacético; AIB, ácido 4-(3-indol)-butírico; ANA, ácido 1-naftalenacético; BAP, 6-bencilaminopurina; CIN, 6-furfuril-aminopurina y AG₃, ácido giberélico.

Medios	11	5001	1,0001	5,0001	10,0001
I	3.1916	381.20	537.15	1987.00	3833.40
II	0.7066	325.20	444.75	1554.00	2967.40
III	0.8627	354.35	539.85	2054.60	3995.95
IV	0.8032	358.25	512.20	1896.50	3664.40
V	0.7456	337.25	471.20	1678.95	3237.30

Tabla 5. Costo en dólares de distintos volúmenes de los medios de propagación.

Medios	11	5001	1,0001	5,0001	10,0001
VI	3.1501	365.00	519.35	1947.35	3758.75
VII	0.6651	309.00	426.95	1514.35	2892.75
VIII	0.7827	316.85	476.05	1771.80	3438.35
IX	0.7557	338.05	490.40	1838.35	3548.10
X	0.6981	317.05	449.40	1620.80	3121.00
XI	0.6931	314.55	444.40	1595.80	3071.00

Tabla 6. Costo en dólares de distintos volúmenes de los medios de pre- y enraizamiento.

5.3. Brotación de las variedades

5.3.1. Análisis cualitativo

Después de los 75 días de propagación, se llevó a cabo una descripción cualitativa de los brotes que habían aparecido en los diversos medios, para las tres variedades de fresa. Las características que se consideraron para efectuar dicha descripción fueron la brotación y su abundancia relativa; la presencia de callos, su color, apariencia, necrosamiento y si tenían raíces o no; el aspecto general de la hojas, raíces y pecíolos de las plántulas; la vitrificación y la necrosis u oxidación general (Figura 4). Además se estableció una predicción a priori sobre el futuro de las plantas obtenidas en los

diferentes medios de cultivo. Las principales observaciones se resumen a continuación.

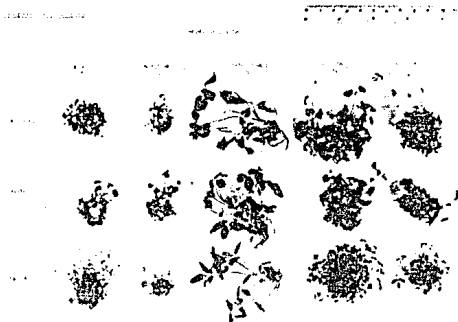


Figura 4. Comparación de los brotes obtenidos en los medios de propagación (I, II, III, IV, V) para las tres variedades de fresa (Fern, Douglas y Tioga).

Variedad Fern (Figura 5)

Medio I. La brotación es positiva, pero escasa. En la base de los inóculos se desarrollan grandes callos rojos, de apariencia compacta, dura y en ocasiones muy oxidados. En estos casos, existe una sustancia negra que difunde a través del medio de cultivo. De los callos salen raíces de 2 a 3 cm de largo o incluso mayores. Las plántulas tienen pecíolos de tono verde-amarillento o rojizo y de longitud intermedia; las hojas más abundantes son unifoliadas de aspecto clorótico (amarillentas). Algunas de las láminas de las hojas adquieren un tono rojizo en toda la superficie foliar o en sus bordes.

Predicción: Número escaso de brotes de mala calidad, a pesar de la presencia de raíces. Se necesitará un buen medio de recuperación para las siguientes etapas.

Medio II. La brotación es similar en escasez a la anterior o quizá un poco mejor. Las características generales son parecidas a las del primer medio. Las diferencias importantes se relacionan con el color de los callos, pues van del verde-amarillento al rojo (pocas veces) y no presentan necrosis. Además, el desarrollo de la lámina foliar parece un poco mejor que en el caso anterior, aunque su tamaño y color son similares. Ausencia de raíces en los callos y en las plantas.

Predicción: Pocos brotes de mala calidad. El medio de las siguientes resiembras deberá ser bueno.

Medio III. La brotación resulta muy escasa, pues en los seis frascos revisados no hay en total más de 30 plántulas. Estas

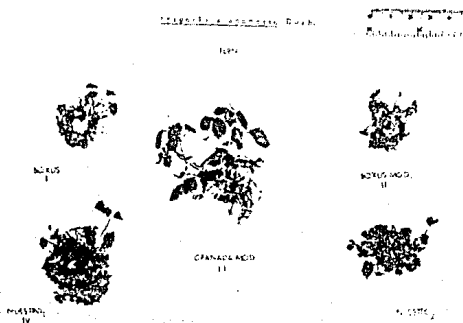


Figura 5. Brotes de la variedad Fern en los medios de propagación I, II, III, IV y V.

presentan pecíolos largos y gruesos que casi ocupan todo el frasco, de color verde pálido, con hojas verdes uni y trifoliadas. Las raíces son sumamente abundantes y miden de 3 a 6 cm de largo. No hay callosidades, ni vitrificación ni oxidación. Las plantas se ven completamente sanas y vigorosas.

Predicción: Muy poco brotes de excelente calidad que podrán pasarse a medios de recuperación pobres en sales minerales. Sin embargo, aun cuando el tamaño y la calidad de las plantas es idónea, la escasez de brotación no lo hace recomendable para un proceso de propagación.

Medio IV. La respuesta de brotación es abundante y las plantas se hallan muy juntas unas con otras. Presentan pecíolos cortos o largos, enrollados en ocasiones, de color verde pálido, con hojas uni y trifoliadas. Las láminas foliares son grandes, de color verde pálido y verde oscuro natural, pero muchas de ellas se encuentran muy enrolladas, por lo que no puede apreciarse toda su extensión. Ausencia de raíces, callos, necrosis y vitrificación.

Predicción: La brotación es buena, así como la calidad de las plantas regeneradas. Esta última es mejor que la de I y II, pero no comparable a la del III. Las plántulas pueden asemejarse en medios relativamente pobres de sales y quizá se presenten dificultades en el momento de la separación, debido a su misma abundancia y al enrollamiento foliar.

Medio V. La brotación parece menos abundante que en el caso anterior, pero las plántulas se asemejan mucho. Sin embargo, algunas hojas se hallan oscurecidas (color pardo). Además, se presentan callos de color rojo intenso en la base de los brotes y

raíces delgadas de 3 a 5 cm en el 50% de los inóculos. En su mayoría, las hojas se encuentran enrolladas.

Predicción: similar a la del medio descrito arriba.

Variedad Douglas (Figura 6)

Medio I. El número de brotes es abundante, pero hay serios problemas de oxidación. Los inóculos presentan callos grandes (no tanto como los de Fern en este mismo medio), que van del rojo al negro, por efecto de la necrosis. Este es el único caso en el que todos los callos producen una sustancia negra que difunde por el agar del medio. Las plántulas tienen pecíolos delgados y rojos de diversos tamaños, hojas uní y trifoliadas con láminas poco desarrolladas. En general, las hojas son de dimensiones reducidas, de color verde-amarillento o amarillo pálido (cloróticas) con bordes enrojecidos y frecuentemente parecen estar secas (tonos pardos y flaccidez de los pecíolos). Ausencia de raíces.

Predicción: La brotación resulta buena, mas no la calidad de las plantas. El medio de recuperación deberá ser rico en sales, aunque de alguno de los frascos será prácticamente imposible recuperar algún brote vivo. La necrosis de los callos parece haber interferido con el desarrollo de las plántulas.

Medio II. La brotación es relativamente abundante, junto con la necrosis de los callos, aunque en menor grado que en el medio anterior. Los callos son menos evidentes en este caso, pero también se encuentran en la base de las plántulas. Estas no desarrollan raíces y presentan pecíolos delgados, chicos y rojos,

con láminas foliares de tamaño reducido o intermedio. Las hojas son unifoliadas, de color verde-amarillento, amarillo o pardo.

Predicción: La brotación es buena, pero no la calidad de las plantas producidas.

Medio III. La brotación prácticamente no existe, pues pueden contarse entre 18 y 20 plantas totales (recuérdese que el experimento se inició con 12 inóculos). No hay callos en la base de los brotes, ni fenómenos de vitrificación o necrosis. Las plántulas desarrollan raíces abundantes de 3 a 6 cm, peciolo sonrosados, largos y gruesos; hojas uni y trifoliadas grandes y verdes (aunque también se presentan unas cuantas amarillentas).

Predicción: Las plantas son de primera, pero la ausencia de brotes imposibilita su uso para micropropagación.

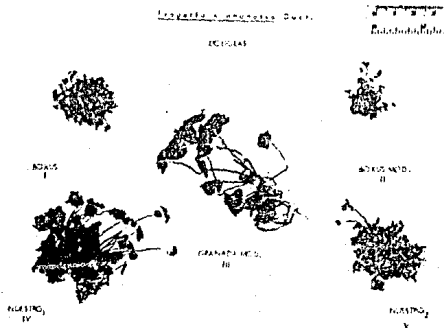


Figura 6. Brotes de la variedad Douglas en los cinco medios de propagación.

Medio IV. La brotación es buena, abundante. Las plántulas no presentan callos, vitrificación, necrosis, ni tampoco raíces. Sus pecíolos son de distintas longitudes y grosores, de color verde pálido o sonrosado y sus láminas foliares grandes, (no tanto como en el medio III), verde oscuras, pero enrolladas. Las plántulas se aprecian muy compactas en cada montón de brotes.

Predicción: Brotación abundante de plantas de buena calidad. Se presentarán dificultades en el momento de separar las plántulas, pero podrán resemejarse en medios pobres en sales minerales.

Medio V. Las plántulas que brotaron tienen casi las mismas características que las del medio IV: pecíolos de diversos tamaños, verdes y sonrosados, láminas foliares enrolladas en los dos tipos de hojas, carencia de raíces, etc.

Predicción: Brotación de plantas parecida a la del medio IV. La calidad de las plantas es mejor que en I y II, pero peor que en III.

Variedad Tioga (Figura 7)

Medio I. Brotación abundante. Las plántulas presentan callos grandes de color rojo intenso en su base. En algunos casos se aprecia una coloración negra en dichos callos, debido a cierta necrosis incipiente. De estas estructuras salen raíces escasas o numerosas de 1 y 3 cm, que van del color rojo al blanco. Los pecíolos de las plántulas son alargados y delgados, del mismo color que las callosidades. Algunas hojas uni y trifoliadas tienen un color amarillo y verde-amarillento, otras están pardas

y parecen secas. El desarrollo de la lámina foliar es poco evidente en la mayor parte de las plántulas.

Predicción: La calidad de los brotes es escasa, aunque la brotación sea abundante. Sin embargo, los brotes parecen fácilmente separables por la poca dimensión de las láminas foliares.

Medio II. Brotación presente, pero escasa. La masa de brotes contiene en su base callosidades rojas, pero no son tan conspicuas, no tienen raíces ni se oscurecen como las del medio I. Los pecíolos son alargados, delgados y de color verde-amarillento o rojo. Hojas uni y trifoliadas con láminas escasamente desarrolladas, de color amarillo o verde claro; algunas de ellas tienen los bordes ligeramente oscurecidos.

Predicción: La calidad de las plantas no es excelente, así que se necesitará un buen medio de resiembra para recuperarlas. No obstante, la separación de los brotes se hará fácilmente.

Medio III. No hay producción de brotes, pues pueden contarse 15 plantas en total, de las 12 que se colocaron al inicio del experimento. Por esta misma razón su calidad es excelente: sin callos, oxidación o vitrificación. Las plantas tienen pecíolos largos y perfectamente desarrollados, con hojas uni y trifoliadas de color verde intenso y verde pálido. Las láminas foliares están bien desarrolladas, así como las abundantes raíces, cuya longitud va de 3 a 8 cm.

Predicción: Excelente calidad de las plantas, pero no hubo desinhibición de yemas axilares.

Medio IV. Brotación abundante. No se presentan callos en la base de los grupos de plantas. Aparecen como conjuntos muy

compactos de plantas de distintos tamaños, sin raíces. Vitrificación y necrosis ausentes. Las plántulas presentan pecíolos de diferentes tamaños y longitudes, de color verde pálido, con hojas bien desarrolladas.

Predicción: La excelente calidad de las plantas producidas asegurará su recuperación en un medio bajo en sales. Puede presentarse alguna dificultad en el momento de su separación, por lo que es conveniente pasar por la etapa de pre-enraizamiento.

Medio V. Brotación abundante. Sólo en ciertos casos se encuentran algunos callos y raíces de 1 ó 2 cm. Las plántulas también se agrupan en conjuntos compactos, como en el medio anterior. Los pecíolos pueden ir del verde pálido al rojo pálido, pero este color nunca es tan intenso como en los medios I y II.

Predicción: Brotación de buena calidad, pero se presentarán dificultades al separar las plantas. En caso de elegir, se preferiría el medio IV para propagar.

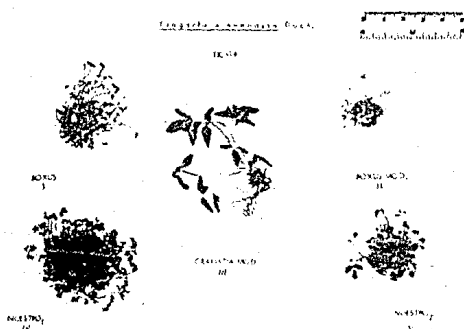


Figura 7. Brotes de la variedad Tioga en los medios de propagación (I, II, III, IV, V).

5.3.2. Análisis cuantitativo

En una aproximación general, las tres variedades de fresa respondieron positivamente en los medios de propagación, pero con distintas eficiencias. Si se consideran los promedios de las respuestas de cada variedad en todos los medios de propagación, la variedad Fern es la que dio una respuesta menor, con un valor experimental de 13.9 brotes por cada inóculo sembrado, seguida de Douglas con 36.8 brotes y de Tioga con 56.4. El análisis estadístico de estos datos demuestra que las diferencias entre las respuestas de las variedades son altamente significativas (0.00001), con un 95% de confianza (Tablas 7 y 8; Figura 8).

Por su parte, los medios nutritivos se comportaron de la siguiente manera: el III prácticamente no estimuló el desarrollo de yemas axilares en ninguna de las variedades (2.9 brotes por inóculo); mientras que el I y II produjeron 34.1 y 32.4 brotes por inóculo respectivamente, lo cual los hace iguales desde un punto de vista estadístico; así como el IV y V que generaron 55.2 y 54.8 brotes. Estos últimos resultaron los tratamientos de propagación más efectivos en el proceso de desinhibición de yemas laterales. El análisis de varianza correspondiente también prueba el grado de significación de estos resultados (Tablas 7 y 9; Figura 9).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F.cal.	N. sig.
EFFECTOS	59662.978	6	9943.830	38.081	0.00001
Trat.	32601.889	4	8150.472	31.213	0.00001
Var.	27061.089	2	13530.544	51.817	0.00001
FACTOR DE INTERACCION	11901.494	8	1487.687	5.697	0.00001
Trat.x var.	11901.494	8	1487.687	5.697	0.00001
RESIDUO	19584.083	75	261.121		
TOTAL (CORR)	91148.556	89			

Tabla 7. Análisis multifactorial de varianza para las tres variedades (var.) de fresa y los cinco tratamientos (trat.), con un 95% de confianza.

Var.	n	Promedio	Grupos	Intervalo de confianza del 95%	
F	30	13.966667	*	8.088121	19.845211
D	30	36.800000	*	30.921454	42.678555
T	30	56.400000	*	50.521454	62.278555

Tabla 8. Comparación entre los promedios de brotes para las tres variedades de fresa (var.) en los cinco medios de propagación: F, Fern; D, Douglas; T, Tioga.

Trat.	n	Promedio	Grupos	Intervalo de confianza del 95%	
III	18	2.861111	*	-4.728059	10.450280
II	18	32.361111	*	24.771941	39.950288
I	18	34.083333	*	26.494163	41.672500
V	18	54.083333	*	46.494163	61.672500
IV	18	55.222222	*	47.633052	62.811399

Tabla 9. Comparación entre los promedios de brotes para los tratamientos de propagación (trat.) de las tres variedades de fresa.

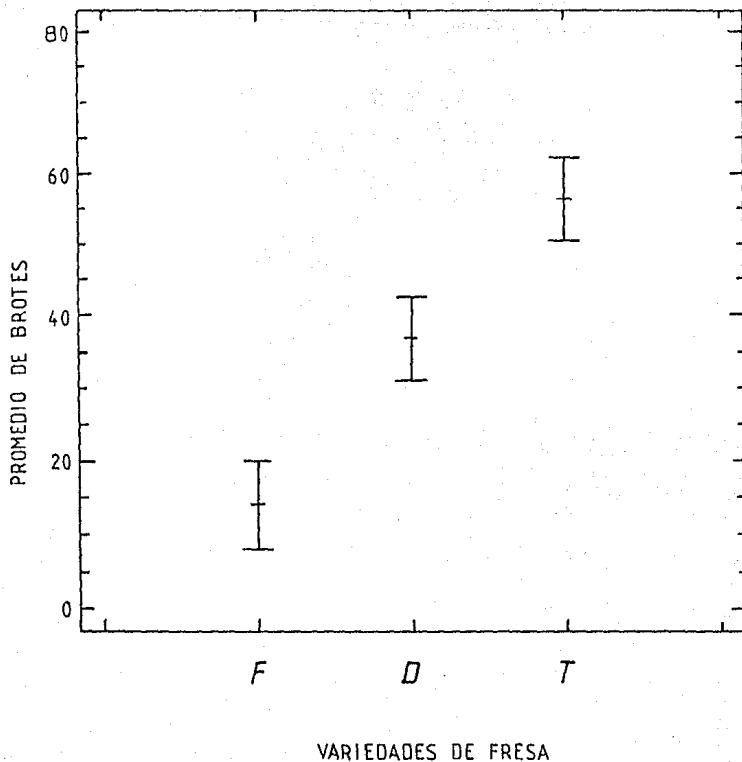


Figura 8. Gráfica de promedios de brotes vs variedades de fresa: F, Fern; D, Douglas y T, Tioga.

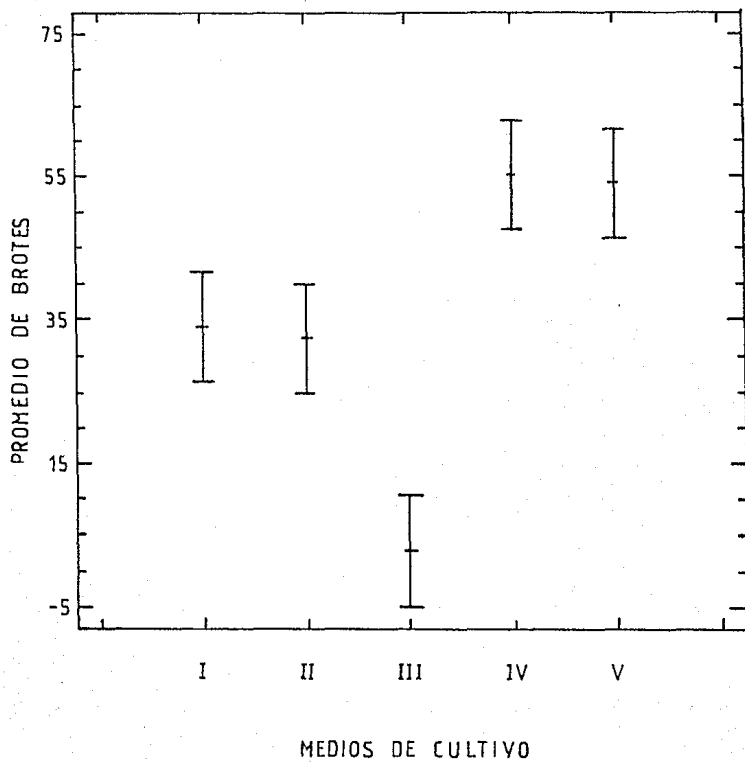


Figura 9. Gráfica de promedios de brotes vs medios de cultivo.

Si ahora se pasa a considerar el experimento de forma individual, cada variedad respondió particularmente en los tratamientos de propagación (Tabla 10; Figuras 10 y 11). La mejor respuesta se obtuvo con la variedad Tioga en el medio IV (98.4 brotes en promedio), pero también la peor con el III (1.8 brotes). Según el análisis estadístico, los medios I, II y V forman un grupo homogéneo entre sí (54.5, 49.2 y 78.0 brotes respectivamente), al igual que el IV y el V.

Trat.	Var.	n	Promedio	Grupos homogéneos
III	T	6	1.833335	*
III	D	6	3.083335	*
III	F	6	3.666665	*
II	F	6	7.333335	*
I	F	6	12.333335	* *
V	F	6	22.250000	* * *
IV	F	6	24.250000	* * * *
I	D	6	35.416665	* * * *
II	D	6	40.500000	* * * *
IV	D	6	43.000000	* * * *
II	T	6	49.250000	* * * *
I	T	6	54.500000	* * *
V	D	6	62.000000	* *
V	T	6	78.000000	* *
IV	T	6	98.000000	*

Tabla 10. Comparación entre los promedios de brotes para los tratamientos de propagación y las tres variedades de fresa: F, Fern; D, Douglas y T, Tioga.

La variedad Fern tuvo un comportamiento similar, aunque con valores más pequeños, pues el medio III apenas produjo brotación (3.7 de promedio), mientras que el IV fue el más eficaz de todos (24.3). Los otros indujeron respuestas relativamente similares: I (12.3), II (7.3) y V (22.3), resultando los dos primeros

parecidos al III, el I incluido en el intervalo de confianza del V y éste similar al IV.

Por último, la variedad Douglas respondió con mayor eficacia en el V (62.0 brotes) que en el IV (43.0), aunque junto con el II (40.5) forma un grupo estadísticamente homogéneo. El I (35.4) se superpone con el II y IV, mientras el III genera la respuesta más pobre (3.1).

Con el objeto de apreciar mejor estas comparaciones, se realizaron análisis de varianza para las tres variedades por separado (Tablas 11-16; Figuras 12-14). Todas las diferencias resultaron muy significativas (0.00001), aunque varios de los intervalos de confianza del 95% se superponen entre ellos.

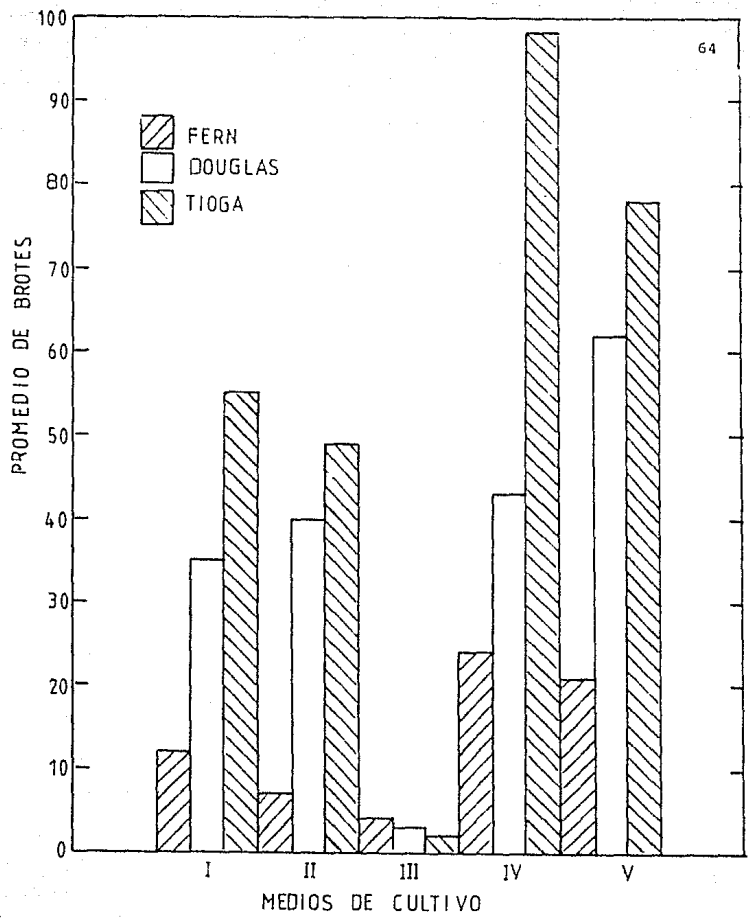


Figura 10. Histograma de las tres variedades de fresa en los cinco medios de cultivo.

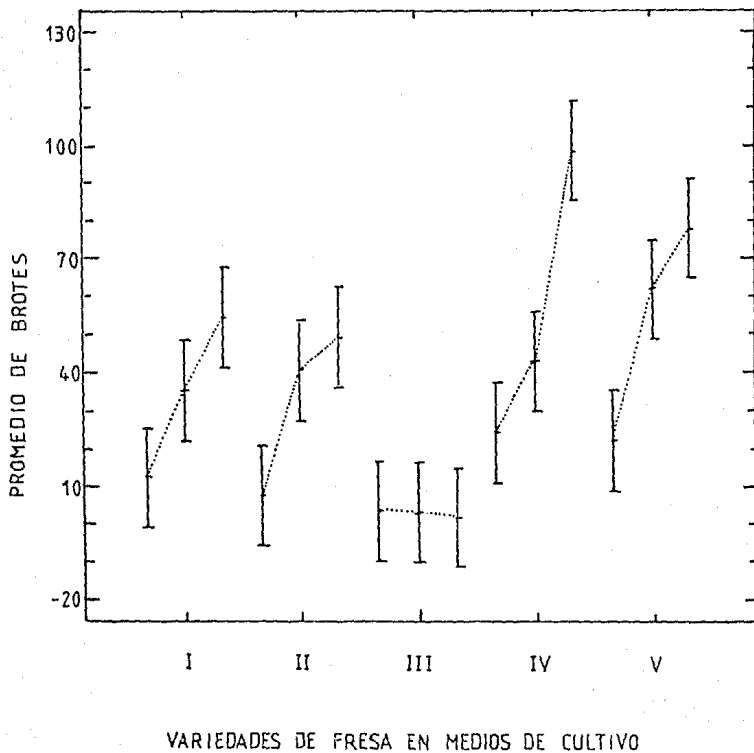


Figura 11. Gráfica de promedios de brotes vs variedades de fresa en los medios de cultivo.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F.cal.	N. sig.
Entre grupos	1962.7167	4	490.67917	13.975	0.00001
Dentro gpos.	877.7500	25	35.11000		
Total (corr.)	2840.4667	29			

Tabla 11. Análisis de varianza para la variedad Fern, con un 95% de confianza.

Trat.	n	Promedio	Grupos	Intervalo de confianza del 95%	
III	6	3.666667	*	-1.316585	8.649919
II	6	7.333333	*	2.350081	12.316585
I	6	12.333333	* *	7.350081	17.316585
V	6	22.250000	* *	17.266748	27.233252
IV	6	24.250000	*	19.266748	29.233252

Tabla 12. Comparación entre los promedios de brotes para los tratamientos de propagación de la variedad Fern.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F.cal.	N. sig.
Entre grupos	10955.383	4	2738.8458	13.054	0.00001
Dentro gpos.	5245.417	25	209.8167		
Total (corr.)	16200.800	29			

Tabla 13. Análisis de varianza para la variedad Douglas con un 95% de confianza.

Trat.	n	Promedio	Grupos	Intervalo de confianza del 95%	
III	6	3.083333	*	-9.098634	15.265300
I	6	35.416667	*	23.234700	47.598634
II	6	40.500000	* *	28.318033	52.681967
IV	6	43.000000	* *	30.818033	55.181967
V	6	62.000000	*	49.818033	74.181967

Tabla 14. Comparación entre los promedios de brotes para los tratamientos de propagación de la variedad Douglas.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F.cal.	N. sig.
Entre grupos	31585.283	4	7896.3208	14.665	0.00001
Dentro gpos.	13460.917	25	538.4367		
Total (corr.)	45046.200	29			

Tabla 15. Análisis de varianza para la variedad Tioga con un 95% de confianza.

Trat.	n	Promedio	Grupos	Intervalo de confianza del 95%	
III	6	1.833333	*	-17.681495	21.348160
II	6	49.250000	*	29.735171	68.764833
I	6	54.500000	*	34.985171	74.014830
V	6	78.000000	* *	58.485171	97.514833
IV	6	98.416667	*	78.901838	117.931500

Tabla 16. Comparación entre los promedios de brotes para los tratamientos de propagación de la variedad Tioga.

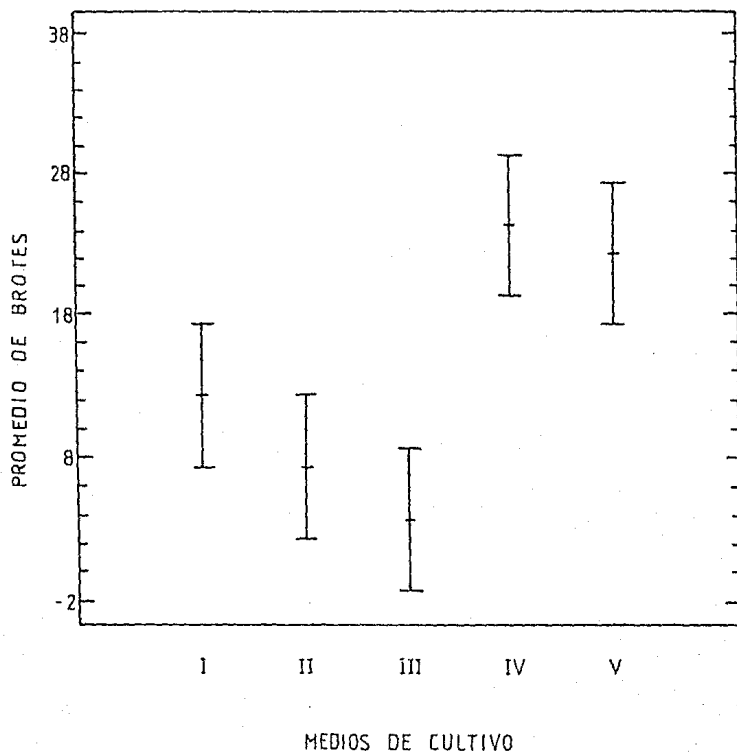


Figura 12. Gráfica de promedios de brotes vs medio de cultivo para la variedad Fern.

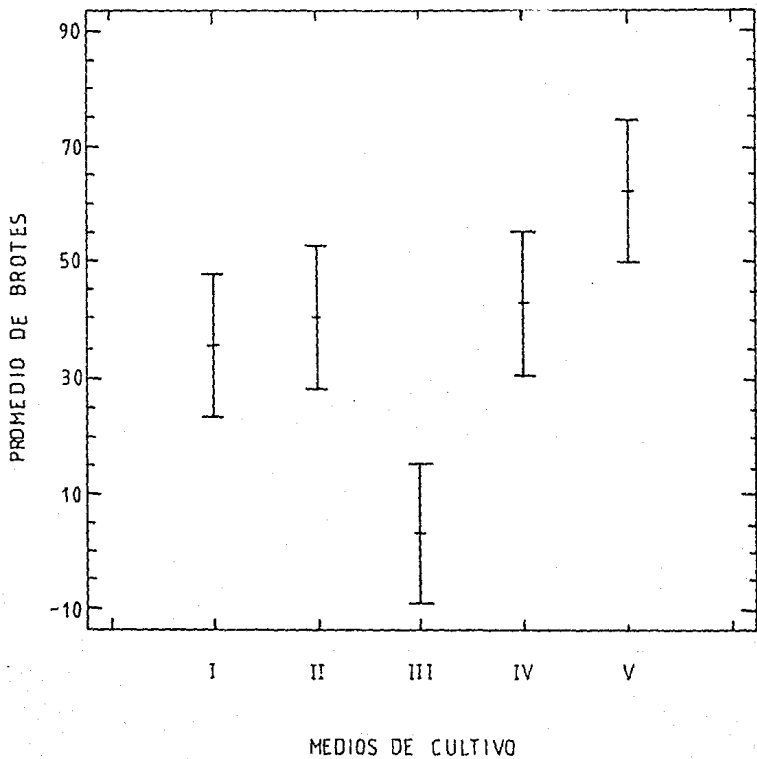


Figura 13. Gráfica de promedios de brotes vs medio de cultivo para la variedad Douglas.

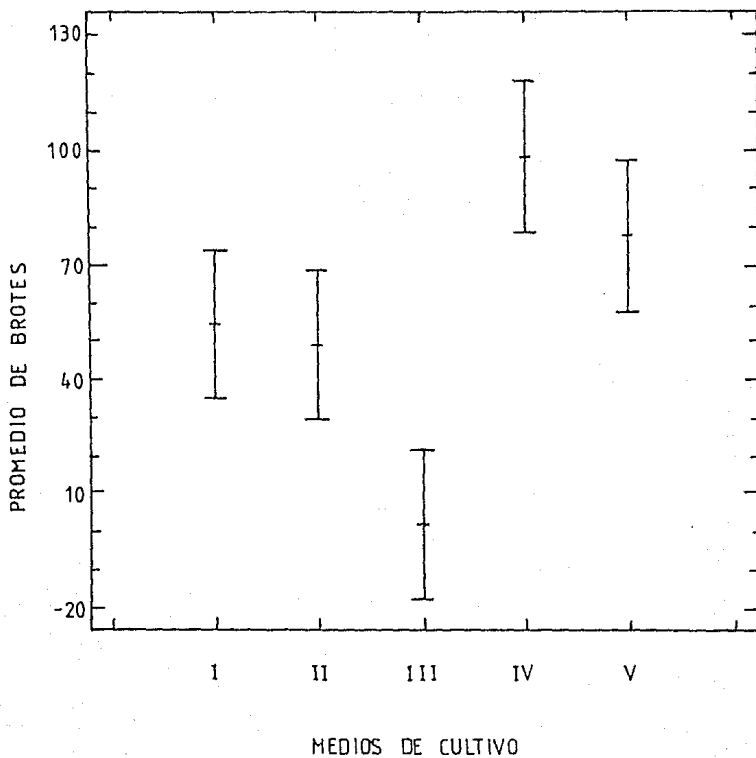


Figura 14. Gráfica de promedios de brotes vs medio de cultivo para la variedad Tioga.

5.4. Enraizamiento de las variedades

Como se señaló en la presentación de la metodología (Cf. 4.6.), las plantas obtenidas durante la etapa de propagación se pasaron en bloques a medios de pre-enraizamiento y después de cierto tiempo se resebraron en los mismos medios, pero ya individualizadas por completo.

Desde esta fase de pre-enraizamiento pudieron apreciarse diferencias y similitudes de las plantas en los medios de cultivo. En principio, todos los medios permitieron la aparición de raíces, hojas y pecíolos, pero con características y abundancias distintas.

La variedad Fern, por ejemplo, respondió prácticamente de la misma manera en los tratamientos experimentales y en el control. En la mayoría de los frascos las raíces que se presentaban eran rosadas o blanquecinas y las hojas de tonalidad verde oscuro. Las principales diferencias se dieron entre los medios VI y VII con sus respectivos controles. En el primer caso las plantas tenían hojas rojizas y en el segundo, verde-amarillentas como un síntoma de clorosis, junto con los pecíolos enrojecidos. Ninguno de estos dos rasgos se evidenciaron en los controles. En los medios experimentales restantes no hubo diferencias claras en la calidad de las plantas que crecieron (Figura 15).

Este patrón de respuesta se repitió en las otras dos variedades con mayor o menor intensidad. Las plantas de la variedad Douglas resultaron de una calidad similar en los medios VIII IX, X y XI, con raíces relativamente abundantes, hojas verdes y ausencia de hojas amarillentas o cloróticas. Sin embargo, los medios VI y VII sí indujeron respuestas distintas

comparadas con el control. En estas dos condiciones, las plantas tenían un mayor porcentaje de hojas amarillentas y su talla era mucho menor: mientras que las del medio X casi tocaban la tapa del frasco de cultivo, las de los medios VI y VII apenas alcanzaban la mitad o menos. Por este motivo se clasificaron como plantas de menor calidad que las de los controles (Figura 16).

Algo similar sucedió con la variedad Tioga, pues los medios IX, X y XI no presentaron diferencias entre sí. En todos los casos las plantas eran verdes y con raíces muy abundantes. Tanto que desplazaban el agar formando una pequeña burbuja de aire en la base del frasco. Estas plantas se incluyeron en un grupo de calidad similar. El medio VIII no es tan significativo como los anteriores, quizá por la relativa escasez de plantas, pero puede considerarse dentro de este mismo grupo. Por su parte, el VI y VII no produjeron plantas de tan buena calidad como el control, pues tenían hojas muy amarillentas, tallas menores y los peciolo completamente rojos. En el primero de estos dos casos, el medio se hallaba oscurecido por la descomposición de los remanentes de callos de la etapa previa y las raíces no se presentaban en grandes cantidades (Figura 17).

Una vez transcurrido el lapso de pre-enraizamiento, las plantas se individualizaron y se transfirieron a los medios de enraizamiento. Al cabo de una o dos semanas comenzaron a aparecer las raíces, que se desarrollaron hasta llegar a la base del frasco. Las observaciones que se realizaron en esta etapa fueron similares a las de la anterior: las plantas respondieron igual estando en grupos que individualizadas. En resumen, los controles (medio X) presentan mejores características que los

experimentales VI y VII: plantas mayores, hojas verdes más abundantes y ausencia de oxidación. Asimismo, como en la etapa antes mencionada, no hubo diferencias apreciables en el aspecto de las plantas del resto de los medios (VII, IX, XI) con respecto al control (X) (Figuras 15, 16 y 17).

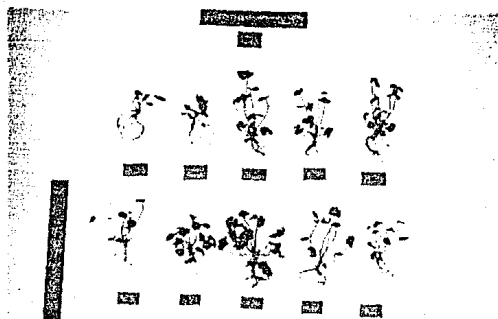


Figura 15. Enraizamiento de la variedad Fern.

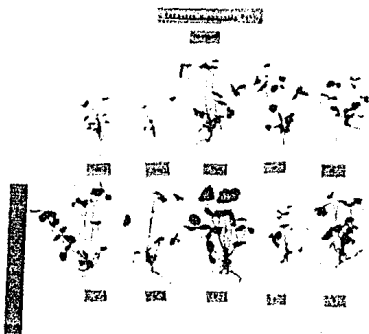


Figura 16. Enraizamiento de la variedad Douglas.

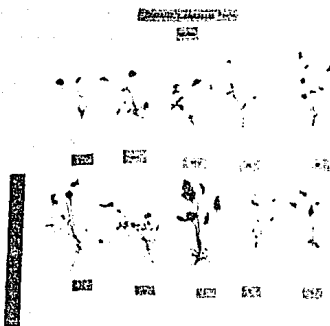


Figura 17. Enraizamiento de la variedad Tioga.

5.5. Contaminación y necrosis

Los principales contaminantes que se tuvieron en los cultivos experimentales de fresa fueron hongos y bacterias. El número de frascos contaminados fue sumamente variable en las distintas etapas o resiembras experimentales. Si se calcula el porcentaje de contaminación general registrado en cada resiembra los resultados son los siguientes: 1.1, 9.5 y 18.3% durante la propagación; 13.6% en el pre-enraizamiento y 31.6% en la última resiembra o enraizamiento.

El total de contaminación en todo el experimento fue del 22%, considerando que se sembraron 935 frascos en total, de los cuales 181 presentaron evidencias de contaminación por bacterias y hongos (19.4%) y 25 indicios dudosos (2.6%).

La necrosis de los explantes de fresa sólo se presentó en medios de cultivo particulares: aquellos que propiciaron la

aparición de callosidades en la base de los explantes (medios I y II principalmente) y cuando no pudieron extraerse por completo, en los de pre- y enraizamiento. El porcentaje de necrosamiento alcanzó un valor del 5% con respecto al total de frascos.

5.6. Almacenamiento en cuartos fríos

Las plantas de fresa *in vitro* se almacenaron en cuartos oscuros a 4°C durante seis y doce meses. Al cabo de estos tiempos, las plantas se habían etiolado, es decir, los meristemas apicales se desarrollaron considerablemente, dándoles un aspecto alargado y débil. Los pecíolos presentaban un color blanquecino y su grosor era muy reducido, debido a la ausencia de luz. Las hojas presentaban la lámina foliar poco desarrollada y las raíces eran totalmente blancas y delgadas. Fue necesario cortar hojas, pecíolos y raíces para colocar los "explantes" en un medio de enraizamiento que les permitiera recuperar sus características normales. Después de dos semanas en este medio, las plantas comenzaron a generar nuevas hojas y raíces. Una vez transcurrido un mes o mes y medio de cultivo, las características de las plantas eran perfectamente normales.

5.7. Adaptación en suelo

Por el procedimiento descrito en los métodos de este trabajo (Cf. 4.8.), el porcentaje de recuperación de plantas fue del 90%. De cien plantas colocadas en el invernadero, noventa resistieron el traspaso, mientras que el resto se deshidrató y murió en las primeras etapas de adaptación.

6. DISCUSION

6.1. Aspectos generales

Los resultados de los experimentos preliminares permiten inferir que las condiciones de crecimiento de las plantas de fresa en las cámaras de cultivo no son demasiado estrictas en cuanto a fotoperíodo, tipo e intensidad de luz y temperatura. De hecho, hay reportes de algunos autores que probaron varias temperaturas en las cámaras de cultivo. Adams (1972), Boxus (1977), Mullin y Van Hoof (1974) han establecido un intervalo óptimo de temperatura entre 20 y 27°C, con un fracaso en el crecimiento de fresa a 19°C (5, 6). La presente experiencia señala que estas plantas son capaces de crecer incluso a 32°C, aunque la deshidratación del medio obliga a realizar resiembras con mayor frecuencia. Por otro lado, según la literatura consultada (5), las condiciones luminosas más adecuadas aún no han sido perfectamente definidas por falta de estudio. Esto determina que se use casi cualquier combinación, intensidad y tipo de luz: de 1,000 a 5,000 luxes, luz continua, diferentes fotoperíodos, etc.

El enraizamiento de las plantas de fresa puede estimularse con el uso de auxinas y de carbón activado (Damiano, 1978) (5). Sin embargo, en la experiencia que se desarrolló en Irapuato no fue necesario ninguno de estos dos productos.

El gelrite es un polisacárido que forma una gelatina transparente y brillante en presencia de sales solubles. Suele emplearse en lugar del agar por las siguientes razones: 1) aunque es más caro por unidad, se necesita en menor cantidad para

obtener un medio con la misma consistencia que el agar, y 2) no contiene materias contaminantes, como compuestos fenólicos, que pueden interferir con el desarrollo y crecimiento de las plantas. El gelrite requiere de cationes divalentes para solidificar, especialmente magnesio. Por tal motivo, funciona como un agente quelante que disminuye la cantidad relativa de este ión en el medio de cultivo. En el caso de la fresa, el gelrite redujo la calidad de las plantas, causando el fenómeno de vitrificación. No se realizaron experimentos para evaluar qué tan importante es este fenómeno o si es reversible cuando las plantas se adaptan a las condiciones ambientales. Pero en una primera etapa se descartó su uso para evitar posibles problemas. Sin embargo, convendría realizar algunos experimentos con este producto, aumentando el suministro de magnesio en los mejores medios de propagación y enraizamiento (IV, V y IX). La disminución del 30% del costo de los medios con gelrite justifica un esfuerzo adicional en este sentido. Por ejemplo, cinco mil litros de medio IV podrían costar 1,332.05 dólares en lugar de 1,896.50, y la misma cantidad de V, 1,105.40 en vez de 1,678.95 (Cf. Tablas 3-6).

Con el objeto de evaluar los precios de producción de los medios nutritivos, se calculó cuánto costaría obtener por cultivo de tejidos 80,000 plantas de fresa al año (número de plantas in vitro que se necesitaría si el mercado estuviera restringido a la Unión de productores de Zamora) (Tablas 17 y 18). También se hicieron los cálculos para 2'800,000 plantas (número de plantas in vitro si la producción se vendiera directamente a los

agricultores (Tablas 19 y 20). Los parámetros de estos cálculos fueron los siguientes:

- Densidad de siembra (propagación): 2 inóculos/frasco.
(Recordar que se realiza una siembra inicial y dos cambios a medio fresco).
- Densidad de siembra (pre-enraizamiento): 1 inóculo original/frasco.
(Cada inóculo representa un conjunto compacto de plantas).
- Densidad de siembra (enraizamiento): 10 plantas/frasco.
- Volumen de medio: 25 ml/frasco.

Estos costos teóricos se calcularon basándose en el esquema experimental planteado en la metodología de este trabajo (Cf. 4.5.), usando el número promedio de brotes generados en cada medio de cultivo y considerando que no se presenta ningún tipo de contaminación.

En ambos casos, los medios de propagación IV (Fern y Tioga) y el V (Douglas) se requieren en menores cantidades, por el alto número de brotes que permiten obtener comparativamente con los demás. Esto provoca que el número de inóculos necesarios para iniciar la fase de multiplicación también sea menor, junto con el tiempo de manipulación de plantas en esta primera etapa.

El medio III resulta mucho más caro que los otros; aunque los costos presentados en las tablas anteriores para dicho medio deben tomarse sólo relativamente, pues sería posible aumentar la densidad de siembra y reducirlos. Como los brotes originados son muy escasos, podrían incluirse, por ejemplo, diez inóculos por

agricultores (Tablas 19 y 20). Los parámetros de estos cálculos fueron los siguientes:

- Densidad de siembra (propagación): 2 inóculos/frasco.
(Recordar que se realiza una siembra inicial y dos cambios a medio fresco).
- Densidad de siembra (pre-enraizamiento): 1 inóculo original/frasco.
(Cada inóculo representa un conjunto compacto de plantas).
- Densidad de siembra (enraizamiento): 10 plantas/frasco.
- Volumen de medio: 25 ml/frasco.

Estos costos teóricos se calcularon basándose en el esquema experimental planteado en la metodología de este trabajo (Cf. 4.5.), usando el número promedio de brotes generados en cada medio de cultivo y considerando que no se presenta ningún tipo de contaminación.

En ambos casos, los medios de propagación IV (Fern y Tioga) y el V (Douglas) se requieren en menores cantidades, por el alto número de brotes que permiten obtener comparativamente con los demás. Esto provoca que el número de inóculos necesarios para iniciar la fase de multiplicación también sea menor, junto con el tiempo de manipulación de plantas en esta primera etapa.

El medio III resulta mucho más caro que los otros; aunque los costos presentados en las tablas anteriores para dicho medio deben tomarse sólo relativamente, pues sería posible aumentar la densidad de siembra y reducirlos. Como los brotes originados son muy escasos, podrían incluirse, por ejemplo, diez inóculos por

Variedad	Medios	Inóculos iniciales	Volumen en litros	Costo aproximado
Fern	I	6,500	243.75	185.84
	II	10,916	409.35	266.24
	III	21,798	817.35	441.30
	IV	3,300	123.75	88.67
	V	3,596	134.85	90.96
Douglas	I	2,258	84.68	64.56
	II	1,976	74.10	48.19
	III	25,978	974.03	525.83
	IV	1,860	69.75	49.98
	V	1,290	48.38	32.63
Tioga	I	1,468	55.05	41.97
	II	1,624	60.90	39.61
	III	43,716	1,639.35	673.64
	IV	814	30.53	21.87
	V	1,026	38.48	25.95

Tabla 17. Costo en dólares de los medios de propagación necesarios para producir 80,000 plantas de fresa *in vitro* en un año.

Variedad	Medios	Volumen en l		Costo aproximado (pre. + enr.)
		pre.	enr.	
Fern	VI/X	162.50	200	264.63/229.86
	VII/X	272.90	200	292.25/299.86
	VIII/X	544.95	200	354.63/334.78
	IX/X	82.50	200	191.00/179.13
	XI/X	89.90	200	182.38/183.83
Douglas	VI/X	56.45	200	187.21/162.61
	VII/X	49.40	200	154.13/158.14
	VIII/X	649.35	200	404.33/381.70
	IX/X	46.50	200	166.66/156.31
	XI/X	32.25	200	146.11/147.27
Tioga	VI/X	36.70	200	172.79/150.09
	VII/X	40.60	200	148.69/152.56
	VIII/X	1,092.90	200	458.15/419.11
	IX/X	20.35	200	148.98/139.72
	XI/X	25.65	200	141.96/143.08

Tabla 18. Costo en dólares de los medios de pre- y enraizamiento necesarios para producir 80,000 plantas de fresa *in vitro* en un año.

Variedad	Medios	Inóculos iniciales	Volumen en litros	Costo aproximado
Fern	I	227,088	8,515.80	3,264.45
	II	381,992	14,324.70	4,250.71
	III	762,943	28,610.36	ND
	IV	115,464	4,329.90	1,642.33
	V	125,843	4,719.11	1,584.62
Douglas	I	79,051	2,964.41	1,592.33
	II	69,136	2,592.60	1,553.06
	III	909,091	34,090.91	ND
	IV	65,116	2,441.85	1,250.72
	V	45,161	1,693.54	797.99
Tioga	I	51,376	1,926.60	1,034.87
	II	56,853	2,131.60	948,20
	III	1'530,055	57,377.06	ND
	IV	28,571	1,071.41	548.78
	V	35,897	1,346.14	634.30

Tabla 19. Costo en dólares de los medios de propagación necesarios para producir 2'800,000 plantas de fresa *in vitro* en un año. (ND: datos no determinados).

Variedad	Medios	Volumen en l		Costo aproximado
		pre.	enr.	(pre. + enr.)
Fern	VI/X	5,677.20	7000	4,765.04/3,956.55
	VII/X	9,549.80	7000	4,787.44/5,165.19
	VIII/X	19,073.58	7000	ND
	IX/X	2,886.60	7000	3,507.86/3,085.61
	XI/X	3,146.08	7000	3,115.86/3,166.59
Douglas	VI/X	1,976.28	7000	3,373.96/2,801.50
	VII/X	1,728.40	7000	2,524.91/2,724.13
	VIII/X	22,727.28	7000	ND
	IX/X	1,627.90	7000	3,061.27/2,692.77
	XI/X	1,129.03	7000	2,496.43/2,537.07
Tioga	VI/X	1,284.40	7000	3,113.90/2,585.56
	VII/X	1,421.33	7000	2,436.08/2,628.30
	VIII/X	38,251.38	7000	ND
	IX/X	714.28	7000	2,737.10/2,407.63
	XI/X	897.43	7000	2,425.30/2,464.79

Tabla 20. Costo en dólares de los medios de pre- y enraizamiento necesarios para producir 2'800,000 plantas de fresa *in vitro* en un año. (ND: datos no determinados).

frasco en las etapas de propagación y pre-enraizamiento, lo que disminuiría en 1/10 su costo. Sin embargo, el número de inóculos que deben manipularse lo hace un medio poco adecuado para trabajar. No resulta lógico ni rentable empezar la experimentación con 20 ó 40,000 "explantes" para producir 80,000 plantas, ni mucho menos 700,000 ó 1'000,000 para producir cerca de tres millones de plantas, pues sería tanto como no llevar a cabo la propagación y comenzar el trabajo con plantas individuales sembradas *in vitro*.

La variedad que resultaría más barato propagar es Tioga, con un costo en dólares de 21.80, seguida de Douglas (32.63) y Fern (88.67).

Con respecto al enraizamiento, el medio XI fue el más barato y también el más pobre (Cf. 4.4.1.). Pero las plantas no presentaron síntomas de clorosis ni tampoco falta de crecimiento. Entonces puede usarse como medio habitual para inducir la aparición y desarrollo de raíces.

Los medios de I y III no resultaron tan eficientes en la propagación como los diseñados en el laboratorio (IV y V). El número de brotes alcanzado supera al reportado en la literatura revisada (5, 6, 12), pues para el primero se indica un promedio de 15 a 25 brotes por inóculo y para el segundo, 20 ó 25 después de seis a ocho semanas de cultivo. Esta disparidad en los resultados (Cf. 5.3.2.) puede ser reflejo de diferencias metodológicas importantes.

Por un lado, el tiempo que permanecieron los inóculos en propagación fue mayor en nuestro caso. Los "explantes" estuvieron entre 60 y 75 días en cultivo, es decir, ocho u once semanas.

Aumentar este tiempo puede llevar al incremento de los brotes producidos, aunque también es cierto que existe un límite espacial cuando las plantas interfieren unas con otras. Además, se realizaron dos resiembras a medio fresco, a diferencia de los dos protocolos consultados en que las plantas permanecen en el mismo medio durante toda la etapa de multiplicación (5, 12). Las resiembras funcionan como un suministro fresco de fitohormonas que parece intensificar el proceso de brotación. Sin embargo, en el caso del medio III, esta resiembra quizá haya sido el factor que impidió la desinhibición de yemas axilares. Los reguladores empleados en este medio son la cinetina y el ácido indolacético (12). El primero de ellos causa la desinhibición de yemas (5, 27) y el segundo parece tener más un efecto sobre el enraizamiento (27). Como el ácido indolacético se degrada por acción de la luz, conforme más tiempo permanezca en el mismo medio, mayor será su oxidación y menores sus efectos. Puede plantearse que la brotación ocurriría en el medio III cuando el nivel de auxina disminuyera al estar ocho semanas expuesto a la luz. Si los "explantes" se transfieren periódicamente a medio fresco, la cantidad de auxina se mantiene relativamente alta e induce la aparición de raíces. Recuérdese que los inóculos sembrados en el medio III en seguida produjeron raíces, lo cual establece mayores posibilidades de absorber nutrientes, recuperar su vigor y mejorar entonces la calidad de las plantas.

Para efectos de una comparación estricta sería necesario llevar a cabo varios experimentos más: trabajar con el sistema de obtención de meristemas de plantas crecidas en condiciones ambientales, para posteriormente aislar plantas de la primera

generación *in vitro* y usarlas en experimentos de propagación. Asimismo, sería necesario comparar la brotación usando exactamente la misma metodología que se reporta en la literatura.

No obstante, si el objetivo de desarrollar la técnica es obtener el mayor número de plantas de calidad, la presente experiencia lo cumple, pues los medios del laboratorio permitieron producir un abundante número de plantas de buena calidad. Además, es necesario aclarar que la técnica de cultivo de tejidos es poco generalizable en cuanto a sus posibilidades de reproducirse siempre igual. Los sistemas de propagación y enraizamiento se suelen comportar de distinta forma en manos de diferentes personas o a veces, incluso, la misma persona puede tener problemas de un intento a otro. Esto se debe quizá a la gran cantidad de factores que deben controlarse en una experiencia de este tipo (Cf. 2.1.4.).

Otro hecho que pudo haber favorecido la brotación es el estado de las plantas usadas como material inicial. Las plantas de la variedad Tioga habían sido propagadas *in vitro* durante varias generaciones, por lo cual estaban perfectamente adaptadas a las condiciones de cultivo. Las otras dos variedades, Fern y Douglas, no habían pasado por tantos ciclos de multiplicación. Esto podría explicar las diferencias entre las respuestas de las tres variedades, pues quizá la primera de ellas tuviera un "vigor *in vitro*" mayor. No obstante, las plantas que se usaron dentro de cada experimento sí fueron de la misma generación. En otras palabras, las diferencias de respuesta en cada medio no son un efecto del vigor de las plantas.

La etapa intermedia que se introdujo entre la propagación y el enraizamiento, llamada arbitrariamente pre-enraizamiento, parece ser decisiva en la recuperación de las plantas recién producidas. Si se intenta separar las plántulas inmediatamente después del ciclo de propagación es muy fácil romperlas con el bisturí. El hecho de dejar las masas de brotes en un medio sin reguladores del crecimiento durante varios días permite una recuperación mucho mejor. Las plantas forman raíces y crecen, individualizándose un poco del resto. Esto hace más fácil su separación, pues no son tan pequeñas como en un principio.

Según la presente experiencia, para efectuar la propagación de estas tres variedades de fresa convendría emplear los medios IV y V para la etapa de multiplicación y el XI para el enraizamiento. Proponemos dejar once semanas en la etapa de propagación, con las resiembras pertinentes e incluir una etapa intermedia de recuperación.

Con respecto a la contaminación, los valores que se obtuvieron en los experimentos son relativamente grandes. Estos porcentajes suelen variar de un experimento a otro, y no pueden predecirse con facilidad. En general, un trabajo cuidadoso y la experiencia de años ayuda a reducirlos dentro de ciertos límites tolerables. La contaminación por hongos y bacterias no debe sobrepasar el 5% del total de frascos sembrados.

El problema de contaminación se da principalmente en el momento de la manipulación del material biológico en condiciones de asepsia. Por lo tanto, las recomendaciones generales que pueden darse apuntan hacia esta etapa del trabajo: 1) limpiar con alcohol la campana antes y durante la siembra, 2) flamear todo el

instrumental antes de tocar el tejido; 3) recambiar las cajas de Petri en donde se llevan a cabo los cortes del material vegetal y 4) sellar los frascos en el momento de llevarlos a los cuartos de cultivo.

Con el almacenamiento en cuartos fríos y con la adaptación de las plantas en suelo no se presentaron mayores problemas. Las plantas que se almacenaron a baja temperatura y en oscuridad se etiolaron después de tres meses de permanecer en estas condiciones. El adelgazamiento y el emblanquecimiento comenzaron a aparecer transcurridos cuatro o cinco meses. No obstante, este proceso probó ser totalmente reversible. Las plantas recuperaron sus características iniciales cuando se resembraron en medios frescos, después de permanecer un mes en las cámaras de crecimiento. Esto último resulta sumamente importante si se desea surtir grandes volúmenes de plantas, pues pueden almacenarse en cualquier etapa del cultivo *in vitro* (5). La distribución de las plantas puede hacerse de manera paulatina o continua, dependiendo de los requerimientos del caso.

Por último, las fresas demostraron ser especialmente fáciles de readaptar a las condiciones del medio ambiente. El porcentaje de sobrevivencia fue excelente, lo cual las hace un sistema adecuado para manejarlo *in vitro*, y también fuera de dichas condiciones.

6.2. Costos de producción de plantas de fresa *in vitro*

Los datos presentados son una aproximación a los costos que implicaría la producción de plantas de fresa *in vitro*. A manera de ejemplo, se han considerado dos mercados potenciales: la Unión

de productores de Zamora, Mich. y los propios agricultores a quienes vende dicha asociación (Cf. 2.2.4.). En el primer caso, el número de plantas que se requiere por año es de 80,000; en el segundo, esta cifra se eleva a 280'000,000 de plantas por año. (En realidad estos números podrían hacerse mucho más grandes si se tomaran en cuenta otras asociaciones regionales como mercados potenciales: Guanajuato, Aguascalientes, etc.). Sin embargo, ninguno de los miembros de las uniones está acostumbrado a utilizar plantas en cultivos *in vitro*, sino plantas adaptadas a las condiciones ambientales. Por otra parte, no resulta rentable emplear palntas "fundadoras" para producir frutos. De cada una de ellas pueden obtenerse al menos cien estolones, para entonces venderlos a los productores. En consecuencia, el número de plantas "fundadoras" que se requeriría en estos dos ejemplos hipotéticos es 80,000 y 2'800,000 respectivamente.

a) Costos por planta en cuanto a medios de cultivo.- En este caso se usaron los datos de las tablas 17 a 20 para conocer el valor de los medios de cultivo de propagación, pre- y enraizamiento, para luego dividirlo entre el número de plantas que se quieren producir (Tablas 21 y 22). Los costos calculados son de los medios I, II, IV y V (propagación), con sus respectivos medios de pre- y enraizamiento (VI, VII, IX y XI); el III fue descartado por su poca rentabilidad (Cf. 6.1.).

b) Costos por planta en cuanto a manipulación.- Para calcular estos costos se planteó el siguiente esquema de manipulación:

Variedad	Medios	Costo	Costo/planta	
			Dólares	Pesos
Fern	I + VI	450.47	0.0056	16.80
	II + VII	558.49	0.0070	21.00
	IV + IX	279.67	0.0035	10.50
	V + XI	273.34	0.0034	10.20
Douglas	I + VI	251.77	0.0032	9.60
	II + VII	202.32	0.0025	7.50
	IV + IX	216.64	0.0116	8.10
	V + XI	178.74	0.0022	6.60
Tioga	I + VI	214.76	0.0027	8.10
	II + VII	188.30	0.0023	6.90
	IV + IX	170.85	0.0021	6.30
	V + XI	167.91	0.0021	6.30

Tabla 21. Costo por planta en distintas combinaciones de medios de propagación y enraizamiento (Total de plantas producidas: 80,000).

Variedad	Medios	Costo	Costo/planta	
			Dólares	Pesos
Fern	I + VI	8,029.49	0.00287	8.61
	II + VII	9,038.15	0.00323	9.69
	IV + IX	5,150.19	0.00184	5.52
	V + XI	4,700.48	0.00168	5.04
Douglas	I + VI	4,966.29	0.00177	5.31
	II + VII	3,677.97	0.00131	3.93
	IV + IX	4,311.99	0.00154	4.62
	V + XI	3,294.42	0.00118	3.54
Tioga	I + VI	4,148.77	0.00148	4.44
	II + VII	3,384.28	0.00121	3.63
	IV + IX	3,285.88	0.00117	3.51
	V + XI	3,059.60	0.00109	3.27

Tabla 22. Costo por planta en distintas combinaciones de medios de propagación y enraizamiento (Total de plantas producidas: 2'800,000).

Etapas 1 (propagación): Cada inóculo se maneja individualmente.

Etapas 2 (prop.): *ibid.*

Etapas 3 (prop.): Cada inóculo o conjunto de brotes se divide en dos.

Etapas 4 (pre-enr.): Cada masa de brotes se divide nuevamente en dos, resultando cuatro inóculos con respecto al original.

Etapas 5 (enr.): Los conjuntos de brotes se dividen en el total de plantas que contiene, para obtener el número total requerido.

Un ejemplo podría ayudar para ver cómo fue calculado el número de manipulaciones por planta: Para comenzar la propagación de 80,000 plantas de fresa de la variedad Tioga, en el medio IV, son necesarios 814 inóculos. Si se utiliza el esquema de manipulación establecido anteriormente, en las etapas 1 y 2 se procesan 814×2 inóculos (1,628); en la 3, se procesan también 1,628 inóculos, pues los originales se dividen en dos. En la etapa de pre-enraizamiento el número de "explantes" sube a $1,628 \times 2$ (3,256). En la última etapa, los inóculos ascienden a 80,000 plántulas que es necesario poner a enraizar. Sumando todos estos datos, el resultado es 86,512 manipulaciones para producir el total de plantas requerido, es decir: $86,512 \text{ manip.}/80,000$ plantas es igual a un índice de 1.081.

Para obtener el costo de la manipulación por planta se consideró que un técnico puede procesar 75 plantas por hora, con un costo de 0.33 de dólar (\$1,000.00: salario mínimo por hora); es decir, 0.0044 de dólar (\$13.33) cada manipulación por planta (Tabla 23).

Variedad	Medios	Manipulaciones por planta	Costo/planta	
			Dólares	Pesos
Fern	I + VI	1.650	0.00733	22.00
	II + VII	2.092	0.0093	27.89
	IV + IX	1.330	0.00591	17.73
	V + XI	1.360	0.00604	18.13
Douglas	I + VI	1.225	0.00544	16.33
	II + VII	1.198	0.00532	15.97
	IV + IX	1.186	0.00527	15.81
	V + XI	1.129	0.00502	15.05
Tioga	I + VI	1.147	0.0051	15.29
	II + VII	1.162	0.00516	15.49
	IV + IX	1.081	0.00480	14.41
	V + XI	1.103	0.00490	14.71

Tabla 23. Costo por planta en cuanto al número de manipulaciones que deben efectuarse para producir 80,000 y 2'800,000 plantas.

c) Número de trabajadores necesarios.- En una primera aproximación, para obtener 80,000 plantas por año, se consideró que se trabajan 240 días efectivos por año (sin fines de semana, días festivos y diez días de vacaciones). Sería necesario producir 334 plantas por día, lo cual puede hacerlo un técnico con salario mínimo y 5 horas de trabajo diario. (En este número ya está considerado el tiempo que se requiere para movilizar frascos, acomodarlos en los cuartos de crecimiento y preparar el material empleado en la campana).

Para la producción de 2'800,000 plantas por año, el resultado es de 31 trabajadores produciendo 11,667 plantas por día, a un ritmo de 375 plantas por técnico en 5 horas de jornada diaria. Sin embargo, estos datos no contemplan que es necesario realizar más de una manipulación por planta producida (Cf. Tabla

23). Por lo tanto, debe multiplicarse el número de técnicos por el de manipulaciones que se requieren en cada medio nutritivo particular (Tabla 24).

Variedad	Medios	Manipulaciones por planta	Técnicos necesarios	
			8×10^4 pl.	2.8×10^6 pl.
Fern	I + VI	1.650	2	51 (17)
	II + VII	2.092	2	65 (22)
	IV + IX	1.330	1	41 (14)
	V + XI	1.360	1	42 (14)
Douglas	I + VI	1.225	1	38 (13)
	II + VII	1.198	1	37 (12)
	IV + IX	1.186	1	37 (12)
	V + XI	1.129	1	35 (12)
Tioga	I + VI	1.147	1	36 (12)
	II + VII	1.162	1	36 (12)
	IV + IX	1.081	1	34 (11)
	V + XI	1.103	1	34 (11)

Tabla 24. Número de trabajadores que se necesitan para producir 80,000 y 2'800,000 plantas por cultivo de tejidos. El número entre paréntesis indica la cantidad de campanas de flujo laminar que deben comprarse, considerando tres turnos de trabajo de 5 horas cada uno.

d) Costo de adaptación de plantas "fundadoras" en suelo.- Para la adaptación de 80,000 plántulas de fresa a las condiciones ambientales, el personal necesario es de doce trabajadores durante doce días, con jornadas de 8 horas/día y ganando salario mínimo. Esto da un costo parcial de 480 dólares por mano de obra. Otros aspectos que es indispensable considerar son 667 charolas con 120 cavidades (1,175 dls.), riego por aspersión (695 dls.), plástico para cubrir las plantas y proporcionarles un ambiente adecuado de humedad (240 dls), sustratos (455 dls.) y agroquímicos (270 dls). El costo total de esta fase de adaptación

es de 3,315 dólares/ 80,000 plantas, en otros términos, 0.0414 dólares por planta (\$124.31).

Con respecto al costo de la adaptación de 2'800,000 plantas, los costos parciales son mucho mayores: mano de obra (16,800 dls.), considerando 168 trabajadores con salario mínimo, 30 días de trabajo y 8 horas de jornada diaria; 23,335 charolas de 120 cavidades (41,070 dls.); riego por aspersión (24,265 dls.); plástico (8,400 dls.), sustratos (15,870 dls.) y agroquímicos (9,335 dls.). No obstante, el costo por planta resulta igual: 115,740 dólares/ 2'800,000 plántulas dan 0.0413 dls. por cada planta producida (\$124.01).

Los costos de los principales aspectos que deben considerarse en la propagación *in vitro* de fresa: medios, manejo o mano de obra y adaptación de las plántulas en suelo se presentan en la tabla 25. El costo total por planta se presenta en la tabla 26.

Variedad	Medios	C o s t o s			
		Medios 8x10 ⁴ pl.	Medios 2.8x10 ⁶ pl.	Manejo	Adaptación
Fern	I	0.0056	0.00287	0.00733	0.0414
	II	0.0070	0.00323	0.0093	0.0414
	IV	0.0035	0.00184	0.00591	0.0414
	V	0.0034	0.00168	0.00604	0.0414
Douglas	I	0.0032	0.00177	0.00544	0.0414
	II	0.0025	0.00131	0.00532	0.0414
	IV	0.0027	0.00154	0.00527	0.0414
	V	0.0022	0.00118	0.00502	0.0414
Tioga	I	0.0027	0.00148	0.0051	0.0414
	II	0.0023	0.00121	0.00516	0.0414
	IV	0.0021	0.00117	0.00480	0.0414
	V	0.0021	0.00109	0.00490	0.0414

Tabla 25. Costo en dólares de los tres aspectos principales que implica la producción de plantas de fresa in vitro: medios, mano de obra o manipulación y adaptación de las plántulas en tierra.

Variedad	Medios	C o s t o s			
		Dólares		Pesos	
		8x10 ⁴ pl.	2.8x10 ⁶ pl.	8x10 ⁴ pl.	2.8x10 ⁶ pl.
Fern	I	0.05433	0.0516	162.99	154.80
	II	0.0577	0.05393	173.10	161.79
	IV	0.05081	0.04915	152.43	147.45
	V	0.05084	0.04912	152.52	147.36
Douglas	I	0.05004	0.04861	150.12	145.83
	II	0.04922	0.04803	147.66	144.09
	IV	0.04937	0.04821	148.11	144.63
	V	0.04862	0.0476	145.86	142.80
Tioga	I	0.0492	0.04798	147.60	143.94
	II	0.04886	0.04777	146.58	143.31
	IV	0.0483	0.04737	144.90	142.11
	V	0.0484	0.04739	145.20	142.17

Tabla 26. Costo en dólares y en pesos de una planta producida en los distintos medios de cultivo y adaptada en condiciones de invernadero.

Resulta interesante comparar estos costos, calculados con base en la experiencia en Irapuato, con los que manejan las asociaciones regionales mexicanas. El precio de las plantas importadas por la unión michoacana es de 60 dólares la caja con 1,500, lo que da un costo por planta de 0.04 dls. (\$120.00) (Datos obtenidos de nuestra conversación con el presidente de dicha Unión, marzo de 1988). La planta de vivero se vende en \$10.00 al agricultor. Por otra parte, una variedad especial de fresa, como por ejemplo Muir, cuesta 55 dólares por caja con 1,000 plantas: 0.055 dls. (\$165.00) cada planta, y se le vende al productor en \$70.00 (Datos proporcionados por un agricultor de fresa de Irapuato, mayo de 1989).

Como puede apreciarse, el costo de las plantas que se producirían en el laboratorio está dentro del intervalo de precios que se conoce en las asociaciones regionales. La diferencia principal radica en el hecho de que ninguno de los agricultores recibe planta "fundadora", sino "F₁" o incluso de más generaciones de vivero (Comunicación personal del Ing. Luis Granada, de FIRA-Banco de México, abril de 1988). Esta planta se utiliza entonces en México como planta "madre", para generar un número determinado de estolones que sirven para surtir a los agricultores. En este sentido, debe sumarse un costo adicional a los precios presentados en la tabla 26, por gastos en la obtención de plantas "madres" y "F₁". Aunque no tenemos el dato exacto, se sabe que en Estados Unidos puede existir un factor de aumento de 100 veces entre las plantas "fundadoras" y las que se vende a los productores mexicanos (Comunicación personal). Por tal motivo, los costos de producción de plantas "madres" o "F₁"

se abaten en un valor que puede suponerse mucho mayor que los costos invertidos en este aspecto.

Debemos mencionar que los costos por cada planta producida son, en realidad, ligeramente mayores que los presentados en las tablas anteriores. Nos faltó considerar algunos aspectos importantes en el valor de las plantas. En primer lugar, en todos los casos debe usarse un número de inóculos mayor que el simplemente necesario para iniciar la producción (Tablas 17 y 18), pues ésta empieza con un número de plantas previamente determinado. En consecuencia, esta nueva consideración cambia los volúmenes de medios nutritivos requeridos. Además, el precio por cada planta producida debe incrementarse por el uso de cajas de Petri desechables (una por cada veinte plantas), alcohol al 70% para limpiar las campanas de flujo laminar y las navajas para procesar los "explantos" (por lo menos una por campana y por turno de trabajo). Estos gastos no se consideran de infraestructura, pues es material usado cotidianamente y que se desecha todos los días. Por último, la producción masiva no está exenta de problemas de contaminación, así que se tiene que incluir un porcentaje de aumento en el costo general de cada planta por este problema. En consecuencia, pensamos que a los costos por planta presentados anteriormente (Tabla 26) debe sumarse entre un 10 ó 20% más por estos factores que no fueron considerados.

7. CONCLUSIONES

El presente trabajo permite llegar a las siguientes conclusiones generales:

1. Las condiciones de crecimiento de las plantas de fresa en las cámaras de cultivo no son muy estrictas en cuanto a tipo, intensidad y fotoperíodo luminoso.

2. Puede emplearse azúcar comercial en lugar de sacarosa en la elaboración del medio nutritivo, tanto para la etapa de propagación como para las de pre- y enraizamiento de plantas de fresa.

3. En la etapa de enraizamiento es posible descartar el uso de carbón activado y auxinas para estimular el desarrollo radical.

4. No debe emplearse gelrite como solidificante en ninguna de las etapas del trabajo con plantas de fresa.

5. Los medios de propagación más baratos y apropiados son el IV y el V, y el de enraizamiento es el XI.

6. El medio IV puede usarse para propagar las variedades de fresa Fern y Tioga, y el V para Douglas. Desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo, estos resultan los mejores medios para propagar estas tres variedades de fresa.

7. El medio XI puede emplearse para efectuar el enraizamiento de las tres variedades, pues es el más económico y las plantas que resultan son de buena calidad.

8. La etapa de pre-enraizamiento es conveniente para permitir el crecimiento de las plántulas de fresa y su posterior individualización.

8. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

Las aplicaciones de un proyecto de propagación *in vitro* de plantas de importancia económica se dan en el área de la industria. En esta sección intentaremos hacer un análisis sobre las posibilidades reales de desarrollar y llevar exitosamente a término un proyecto de transferencia tecnológica de este tipo.

El primer problema grave en México es el grado de avance de los laboratorios de cultivo de tejidos que están interesados en funcionar comercialmente. En la mayoría de los casos (Querétaro, Cuauhtitlán-Izcalli, Chapingo, México, etc.) apenas han comenzado a desarrollar la tecnología de propagación *in vitro* y su infraestructura no es lo suficientemente adecuada para emprender proyectos a gran escala. Quizá los más importantes sean los viveros "El Morro", que funcionan de manera comercial desde hace algunos años. En general, todos son grupos de dimensiones reducidas, con metas a largo plazo y preocupados por las dificultades que plantea la búsqueda de posibles mercados.

Este último aspecto es decisivo cuando se intenta realizar un proyecto de investigación aplicada, pues no basta con desarrollar la tecnología propiamente dicha, sino que debe dedicarse un esfuerzo considerable a la búsqueda de mercados o compradores potenciales. En nuestro país esto es tan difícil que, en ocasiones, la única solución parece ser "maquilar" plantas ornamentales o de otro tipo para compañías no nacionales. Esto limita las posibilidades para crear una tecnología propia y además, determina la dependencia de los intereses e investigaciones extranjeras.

Las dificultades que debe enfrentar cualquier laboratorio que intenta comercializar el cultivo de tejidos en México son muchas y muy complejas. A continuación intentaremos explicar, después de más de dos años de trabajo en el área, las que nosotros consideramos importantes.

Por un lado, los empresarios en México no quieren arriesgar su inversión. Pretenden adquirir "paquetes" tecnológicos completos, sin financiar ningún tipo de investigación que pudiera resultar rentable a mediano o largo plazo. La mayor parte de las veces, los laboratorios no puede ofrecer un "paquete" de este tipo, por el fuerte desembolso inicial que supone prácticamente cualquier trabajo tecnológico y además, porque siempre es conveniente mantener una investigación constante para mejorar las técnicas, lo cual requiere dinero. En el caso de la fresa, por ejemplo, tal vez fuera más importante entrar a la investigación desde el punto de vista de la obtención de nuevas variedades mejoradas, usando herramientas de ingeniería genética y cultivo de tejidos, como se realiza en California. Pero un proyecto así abarcaría un plazo de cinco o diez años, no sólo dos como el de propagación *in vitro*, (y esto principalmente por las experiencias previas que existían al respecto en el momento de iniciar el trabajo). Además, requeriría una inversión considerablemente mayor. Si encontrar comprador para la tecnología *in vitro* de fresa ha sido casi un imposible, el proyecto de obtención de nuevas variedades no tendría ni un solo interesado en financiarlo.

En general, aunque hay notables excepciones, la visión de los empresarios mexicanos es muy reducida: su meta suele ser

siempre obtener las mayores ganancias en el menor tiempo. Esto limita las posibilidades de desarrollo de los proyectos de investigación aplicada que pretendan resolver cualquier problema agrnómico que requiera más de un par de años de investigación. Con mucha frecuencia, los empresarios prefieren continuar la producción con menores rendimientos, si esto les reporta buenas ganancias. De hecho, el monto de las mismas es tan alto que pueden mantener rendimientos bajos, siempre y cuando su desembolso sea lo más reducido posible.

Otro aspecto que indirectamente frena las investigaciones tecnológicas es la dificultad que implica entrar en contacto con las asociaciones de productores, donde podría haber interesados en el uso de algunos productos biotecnológicos.

El caso de la fresa es particularmente ilustrativo al respecto. Efectuamos las primeras investigaciones para determinar el mercado potencial de plantas de fresa en las asociaciones regionales de productores de dicho fruto. La única que visitamos fue la de Zamora, Michoacán, que cubre principalmente el mercado de exportación. Nos entrevistamos con varios propietarios o presidentes de compañías exportadoras de fresa, con el propósito de investigar el posible mercado de esta planta en la región. Las distintas compañías del estado que visitamos fueron Exportadora Agrícola de Zamora, S. A., Servi-Fruit, Inc., Empacadora de Chapala, S. A., Empacadora Inter-Mex, S.A., entre otras. La información que pudimos obtener apunta en varias direcciones. En primer lugar, en caso de interesarse en el proyecto, la cantidad de plantas que comprarían estaría limitada por año, pues desde la formación de esta unión regional se estableció una superficie

tope para dicho cultivo, con el fin de no inundar el mercado de Estados Unidos, con la consiguiente baja de precios. Por otra parte, cuando se les preguntó si comprarían plantas de fresa cultivadas *in vitro*, invariablemente contestaron que existe un convenio con FIRA-Banco de México que, mediante sus laboratorios en Cuernavaca, Morelos, se encargará de suministrar la cantidad de fresa necesaria en el estado. Ya veremos un poco más adelante lo falaz de dicha aseveración.

En este mismo sentido, tuvimos una entrevista con el presidente de la unión de freseros de Zamora, cuya posición no dio lugar a ninguna duda: proyectan comprar la planta "madre" a FIRA, primero parcialmente y luego en su totalidad; no quieren tratar con particulares; esperan ser autónomos y obtener de la SARH el equivalente de la aportación de la unión para instalar un laboratorio que satisfaga sus necesidades. No obstante, el proyecto aún no se ha planeado ni está incluido en ningún presupuesto del estado. En consecuencia, la única posibilidad para cubrir este mercado era entablar una relación directa con FIRA.

Algo importante que resalta de todo lo anterior es la capacidad que tales asociaciones tienen para restringir el mercado. El simple hecho de limitar la cantidad de terrenos dedicados a fresa, por ejemplo, no sólo les asegura los precios altos del producto, sino que sean solamente unos cuantos los que controlan las exportaciones de fresa en la región. El productor de fresa compra siempre al mismo proveedor, por lo que está cautivo dentro de un mercado impenetrable. Llegar hasta los productores mismos, el mercado de plantas de fresa más grande

(280'000,000 vs 8'000,000 de plantas requeridas por la asociación zamorana), supondría un problema que nada tiene que ver con las investigaciones tecnológicas.

Una consideración adicional es la falta de confianza que los empresarios tienen a las investigaciones y a la tecnología generada en el país. En casi todos los casos optan por las variedades y tecnologías que quieran ofrecerles los norteamericanos, incluso a un costo mayor, que las mismas producidas en México.

La siguiente visita que realizamos fue al Centro Demostrativo y de Capacitación Campesina de Tezoyuca, Morelos, que depende del FIRA-Banco de México. Este centro parecía el indicado para lograr una relación no sólo con la asociación michoacana de freseros, sino con las demás que existen en el país. Sus encargados se dedican a la recopilación de trabajos de investigación en diversas ramas de la investigación aplicada y de distintas instituciones. Todo ello con fines no lucrativos. Dan asesoría general a personas interesadas en desarrollar laboratorios de tejidos a nivel comercial e industrial. Además, se comprometen a establecer contacto con otras personas interesadas en comprar plantas producidas *in vitro* y dar asesoría para lograrlo. Durante las conversaciones, nos especificaron con mucha claridad que el convenio de fresa firmado con los productores de fresa de Zamora no contemplaba la entrega de toda la cantidad de fresa que ellos requerían, sino sólo de una pequeña parte para que realizaran experimentos y observaran la calidad de las plantas. Resultaba claro entonces que la asociación regional sabía esto de antemano, pero que no estaba

interesada en establecer otro convenio comercial con nadie que no fueran los vendedores americanos de siempre.

Con respecto a FIRA, nunca logramos establecer contacto con compradores de fresa o de cualquier especie ornamental a través de esta institución, pues nunca se firmó ningún convenio de cooperación y crédito. Los trámites y las dilaciones se complicaron en un grado tal que optamos por abandonar toda relación con ella.

Esto nos permite reflexionar un poco acerca de la participación de instituciones gubernamentales en la transferencia de tecnología. En este caso no puede esgrimirse el argumento de falta de interés o miedo a no recuperar la inversión, como en las compañías privadas. La existencia de oficinas como FIRA-Banco de México demuestra que sí hay interés por parte del gobierno para impulsar el desarrollo de tecnología que pueda venderse a la iniciativa privada. Algo parecido sugiere el proyecto de "riesgo compartido" de CONACYT: por cada peso que invierta cualquier compañía privada en tecnología aplicada, el gobierno entrega una cantidad similar a CONACYT y otra a la institución donde se desarrolla la tecnología para vender. Sin embargo, no siempre funcionan con la rapidez y eficiencia deseadas. Los consabidos trámites burocráticos, la incapacidad de muchos de los representantes de dichas instituciones y las trabas políticas determinan que estos proyectos pocas veces se lleven a cabo.

La poca disposición de los empresarios para reducir un poco sus ganancias a corto plazo, junto con la ineficiencia de las instituciones gubernamentales encargadas de la parte

administrativa ponen de manifiesto lo complicado y desalentador que es emprender un proyecto de investigación aplicada. El esfuerzo para conseguir un usuario dispuesto a invertir en nueva tecnología no siempre justifica el abandono de investigaciones cuya aplicación no sea tan evidente. Quizá sea más importante continuar con proyectos de ciencia básica, en los cuales la aplicación se posterga hacia un futuro más o menos lejano. Al menos en estos casos, la búsqueda de un mercado no es un requisito indispensable para su consecución.

Con respecto a la micropropagación de plántulas de fresa caben las siguientes reflexiones. México es uno de los principales países productores de fresa. Sin embargo, las plantas que se utilizan como material inicial de los campos de cultivo se compran a los Estados Unidos. Estas plantas proceden de cultivo de tejidos, pero han sufrido muchos ciclos de propagación en tierras cuyas características sanitarias se desconocen. Esto las hace particularmente susceptibles a infecciones de virus y demás parásitos que infectan las fresas. En nuestro país puede desarrollarse la tecnología de producción *in vitro* de plantas de fresa. La experiencia de Chapingo y la nuestra propia son muestras de que ello es posible.

Además, el caso de la fresa parece ser idóneo para su comercialización utilizando técnicas de cultivo de tejidos. La herramienta permite generar plantas de una alta calidad fitosanitaria, en menos tiempo que los sistemas tradicionales por semillas y en cantidades relativamente grandes. Por otro lado, es un cultivo común y corriente en México: no hay que crear mercados ni convencer a la gente de la importancia económica de su

cultivo. Basta con hacer evidentes las ventajas de comprar a un proveedor mexicano, sin considerar los intereses creados en torno a este cultivo.

Con respecto a la investigación, se ha seguido con varios aspectos importantes. Los experimentos demuestran la capacidad del sistema de propagación *in vitro*. Hemos logrado disminuir el índice de contaminación por debajo del 3%, aunque preferimos seguir trabajando con márgenes de seguridad del 15 ó 20%, para evitar cualquier eventualidad. Seguimos con la propagación de otras variedades de fresa (Brighton, Parker, Pájaro, Solana), cuyas respuestas no hemos cuantificado aún, pero que van respondiendo en los medio que ya evaluamos.

Por supuesto, la experimentación con más variedades debe seguir. La búsqueda de mayor eficiencia en la propagación, en el manejo de las plantas y en su calidad es un objetivo constante. Algunas de las cosas que restan por hacer son el desarrollo del sistema de aislamiento y crecimiento de meristemas, así como la manera de certificar la sanidad de las plantas producidas *in vitro*. Con respecto a esto último, las técnicas necesarias para efectuar la certificación pueden desarrollarse en el laboratorio, aunque la constancia oficial debe ser expedida por el Departamento de Sanidad Vegetal de la SARH, por lo que convendría comenzar los trámites con esta institución gubernamental.

Quizá podamos llegar a vender la tecnología algún día, si encontramos un usuario dispuesto a invertir en una tecnología relativamente nueva en México.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Boxus, Philippe. "Commercial production of strawberry plants produced by meristem culture and micropropagation". En Colloques Scientifiques, n. 15, 1981, p. 310-348.
2. _____. "Production commerciale de plants fraisiers issus de culture de méristèmes et de micropropagation". En Conferencia presentada en Montreal en "Les perspectives de l'Horticulture", 22 de agosto de 1980. 18 p.
3. _____. "Rapid production of virus-free strawberry by in vitro culture". En Acta Horticulturae, 66, 1976, p. 35-38.
4. _____. "The production of strawberry plants by in vitro micro-propagation". En J. Hort. Sci., 49, 1974, p. 209-210.
5. Boxus, P., C. Damiano y E. Brasseur. "Strawberry". En Handbook of plant cell culture. (Crop species). v. 3. Nueva York: MacMillan, 1984, p. 453-486.
6. Boxus, P., M. Quoirin y J.M. Laine. "Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture". En J. Reinert y P. S. Bajaj (editores). Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture. Berlín, Heidelberg y Nueva York: Springer-Verlag, 1977, p. 130-143.
7. Brusco González, C., M. Cárdenas Alonso y R. Madrigal Lugo. Certificación de plantas de fresa *Fragaria ananassa* Duch., libres de virus, obtenidas por cultivo in vitro de ápices de tallo. México: Universidad Autónoma Chapingo, 1985, p. 8-14.
8. Damiano, C., W. Faedi y D. Cobianchi. "Prove di stolonizzazione in vivaio e osservazioni agronomiche su piante di fragola ottenute da culture in vitro". En Incontro Nazionale S.O.I. sulla "Coltura della fragola", 14 de diciembre de 1979, p. 51-60.
9. Dodds, J. H. y L. W. Roberts. Experiments in plant tissue culture. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. 178 p.
10. Foucault, C. y R. Letouze. "In vitro: Régénération de plants de fraisier à partir de fragments de pétioles et de bourgeons flouraux". En Biologia Plantarum (Praha) 29 (6): 1987, p. 409-414.
11. Gola, G., G. Negri y C. Cappelletti. Tratado de botánica. 2 ed. Barcelona: Labor, 1965. 1160 p.
12. Granada Carreto, L., M. Cárdenas Alonso y R. Madrigal Lugo. Producción in vitro de plantas de fresa. México: Universidad Autónoma Chapingo, 1987. p. 3-7.
13. Guillén, Roberto (editor). Plantas hortícolas. Valencia: Floraprint, 1980. 143 p.

14. Hartmann, H. T. y D. E. Kester. Propagación de plantas. Principios y prácticas. México: CECSA, 1981. 814 p.
15. Hernández Pérez, L. et al. Propagación de plantas por cultivo de tejidos. México: Consejo Nacional de Fruticultura-SARH, 1984. 92 p.
16. Holmes, Sandra. Outline of plant classification. Londres y Nueva York: Longman, 1983. 181 p.
17. Jones, J. K. "Strawberry". En N. W. Simmonds (editor). Evolution of crop plants. Londres y Nueva York: Longman, 1979, p. 237-242.
18. Jones, O. P., B. J. Waller y M. G. Beach "The production of strawberry plants from callus cultures". En Plant cell, tissue and organ culture. v. 12, n. 3, 1988, p. 235-241.
19. Kartha, K. K., N. L. Leung y K. Pahl. "Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets". En J. Amer. Hort. Sci. 105 (4): 1980, p. 481-484.
20. Margara, Jacques. Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse. Paris: INRA, s/f. 262 p.
21. Miller, W.R. et al. "Quality of strawberries packed in different consumer units and stored under simulated air-freight shipping conditions". En HortScience 18 (3): 1983, p. 310-312.
22. Mullin, R. H. y D. E. Schlegel. "Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets". En HortScience 11 (2): 1976, p. 100-101.
23. Murashige, T. y F. Skoog. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". En Physiol. plant., 15: 1962, p. 473-497.
24. Pennell, D. y A. Brogdale Ehs. "Micropropagation, the pros and cons". En Grower, 1981, p. 58-62.
25. Quak, F. "Meristem culture and virus-free plants". En J. Reinert y P. S. Bajaj (editores). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Berlín, Heidelberg y Nueva York: Springer-Verlag, 1977, p. 598-615.
26. Robert, M. L. y V. M. Loyola (compiladores). El cultivo de tejidos vegetales en México. México: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 1985. 167 p.
27. Salisbury, F. B. y C. W. Ross. Plant physiology. 2 ed. Belmont: Wadsworth, 1978. 422 p.

28. Sansavini, S. y G. Gherardi. "Selezione clonale e stabilità genetica di fragole micropropagate". En Incontro Nazionale S.O.I. sulla "Coltura della fragola", 14 de diciembre de 1979, p. 39-46.
29. Seminario sobre procesamiento de frutas tropicales en México. Washington, D.C.: Secretaría General de la OEA, 1976. 421 p.
30. Seymour, John. El horticultor autosuficiente. Barcelona: Blume, 1981. 254 p. (Guía práctica ilustrada para la vida en el campo, 2).
31. Sutter, E., A. Fabbri y S. Dunston. "Morphological adaptation of leaves of strawberry plants grown *in vitro* after removal from culture". En R. Henke et al (editores). Tissue culture in forestry and agriculture. Nueva York y Londres: Plenum Press, 1985, p. 358-359.
32. Swartz, H. J., G. J. Galletta y R. H. Zimmerman. "Field performance and phenotypic stability of tissue culture-propagated strawberries". En J. Amer. Hort. Sci. 106 (5): 1981, p. 667-673.
33. Villalobos, Víctor Manuel (editor). Fundamentos teóricos-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. t. 1. México: Colegio de Postgraduados de Chapingo, 1985. 231 p.
34. Westwood, M. N. Temperate-zone pomology. San Francisco: Freeman, 1978. 428 p.

10. INDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. El cultivo de tejidos vegetales.....	2
2.1.1. Definición e historia.....	2
2.1.2. Tipos de cultivos.....	4
2.1.3. Medios de cultivo.....	8
2.1.4. Factores que afectan las respuestas de los tejidos vegetales en cultivo.....	14
2.1.5. Ventajas y problemas del cultivo de tejidos.....	16
2.2. La fresa.....	21
2.2.1. Taxonomía.....	21
2.2.2. Descripción botánica.....	21
2.2.3. Historia del cultivo.....	23
2.2.4. El cultivo de fresa en México.....	24
2.3. El cultivo de tejidos de fresa.....	26
2.3.1. Antecedentes.....	26
2.3.2. La experiencia de Boxus.....	29
2.3.3. La experiencia en Chapingo.....	33
3. Justificación del trabajo y objetivo.....	35
4. Materiales y métodos.....	36
4.1. Material vegetativo.....	36
4.2. Procesamiento del material vegetativo.....	36
4.3. Experimentos preliminares.....	36
4.4. Medios de cultivo.....	37
4.4.1. Composición y preparación.....	37
4.4.2. Costos.....	39
4.5. Diseño experimental.....	39

4.5. Diseño experimental.....	39
4.6. Condiciones del cuarto de cultivo.....	40
4.7. Almacenamiento en cuartos fríos.....	40
4.8. Adaptación de las microplantas en suelo.....	42
5. Resultados.....	44
5.1. Experimentos preliminares.....	44
5.2. Costo de los medios.....	46
5.3. Brotación de las variedades.....	49
5.3.1. Análisis cualitativo.....	49
5.3.2. Análisis cuantitativo.....	58
5.4. Enraizamiento de las variedades.....	71
5.5. Contaminación y necrosis.....	74
5.6. Almacenamiento en cuartos fríos.....	75
5.7. Adaptación en suelo.....	75
6. Discusión.....	76
6.1. Aspectos generales.....	76
6.2. Costos de producción de plantas de fresa <i>in vitro</i>	85
7. Conclusiones.....	95
8. Perspectivas del proyecto.....	96
9. Referencias bibliográficas.....	104
10. Índice.....	107